

Aus der Klinik für Pädiatrie m. S. Pneumologie und Immunologie
Charité-Campus Virchow Klinikum
Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin
(Direktor: Professor Dr. med. Ulrich Wahn)

**Mechanismus der Allergen-induzierten Ausbildung von
Atemwegs-Entzündung und Atemwegs-Hyperreaktivität**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia Legendi

für das Fach Kinderheilkunde und Allergologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr. med. Eckard Hamelmann

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

eingereicht am: 15.04.2002

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag: 05.12.2002

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dietrich Reinhard, München

2. Prof Dr. Felix Sennhauser, Zürich.

Für meine Eltern Ingrid und Horst Hamelmann,

Für Lydia

Und für meine Kinder Hannah, Louise und Inga

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Liste der Publikationen	8
II. Liste der Abkürzungen	11
III. Liste der Abbildungen	13
1. Kapitel Einführung	15
1.1 Mechanismus der Atemwegs-Hyperreaktivität	16
1.1.1 Definition von AHR	16
1.1.2 Mechanismus der Atemwegs-Hyperreaktivität	18
1.1.2.1 Abnormalität der Atemwegs-Muskulatur	18
1.1.2.2 Strukturelle Abnormitäten	18
1.1.2.3 Neurologische Abnormitäten	19
1.1.3 Atemwegs-Entzündung und Atemwegs-Hyperreaktivität	20
1.2 Allergische Entzündung in Asthma bronchiale	22
1.2.1 Humorale Faktoren	22
1.2.1.1 Membranabkömmlinge	23
1.2.1.2 Zell-Granula	24
1.2.1.3 Zytokine	25
1.2.2 Entzündungs-Zellen	27
1.2.2.1 Mastzellen	27
1.2.2.2 Eosinophile Zellen	29
1.2.2.3 Leukozytäre Infiltration	30
1.2.3 T-Zellen in Asthma bronchiale	34
1.2.3.1 IgE-Produktion und Bronchospasmus	35
1.2.3.2 Eosinophile Entzündung und Spätreaktion	41
1.2.3.3 Konzept der Th1 und Th2 Zellen	44
1.3 Tiermodelle der Atemwegs-Hyperreaktivität	46
1.3.1 Tiermodelle für Asthma bronchiale	46
1.3.2 Validität von Tiermodellen	47
1.3.3 Bewertung von Tiermodellen	48
1.4 Ziele der Studie, Fragestellung	50

2.	Kapitel Material und Methoden	53
2.1	Materialien	54
2.1.1	Reagentien	54
2.1.2	Antikörper (AK)	54
2.1.3	Verbrauchsmaterial	54
2.1.4	Geräte	54
2.2	<i>In vivo</i> Tierversuche	55
2.2.1	Versuchstiere	55
2.2.2	Betäubung	56
2.2.3	Sensibilisierung mit Allergen	56
	2.2.3.1 Atemwegs-Sensibilisierung	56
	2.2.3.2 Passive Sensibilisierung	57
	2.2.3.3 Systemische Sensibilisierung	58
2.2.4	Provokation mit Allergen	58
2.2.5	<i>In vivo</i> Zell-Depletion	60
2.2.6	<i>In vivo</i> Zell-Transfer	60
2.2.7	Antikörperbehandlung	60
2.2.8	Bestimmung der kutanen Hyperreaktivität (ICH)	60
2.2.9	Bestimmung der Atemwegs-Reaktivität	61
	2.2.9.1 Bestimmung der trachealen Kontraktilität <i>in vitro</i>	61
	2.2.9.2 Bestimmung der Resistenz <i>in vivo</i>	62
	2.2.9.3 Barometrische Plethysmographie <i>in vivo</i>	64
2.3	<i>In vitro</i> Versuche	64
2.3.1	Bestimmung der Immunglobuline mittels ELISA	64
2.3.2	Präparation von Zellen	65
2.3.3	Zell-Proliferation	65
2.3.4	CD8 ⁺ T-Zell-Isolierung	66
2.3.5	T-Zell-Anreicherung, T-Zell-Depletion <i>in vitro</i>	66
2.3.6	Durchfluß-Zytometrie	66
2.3.7	Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA	67
2.3.8	Bestimmung von zytoplasmatischen Zytokinen mittels FACS	67
2.3.9	Broncho-alveoläre Lavage (BAL)	67
2.3.10	Lungenzell-Isolierung	68

2.3.11	Bestimmung der Eosinophilen Peroxidase (EPO) Aktivität	68
2.3.12	Histologie	68
2.3.13	Immunohistochemie (IHC)	69
2.3.14	<i>In situ</i> Hybridisierung mittels RT-PCR	69
2.4	Datenanalyse	70
3.	Kapitel Ergebnisse	71
3.1	Ergebnisse im Modell der Atemwegs-Sensibilisierung	72
3.1.1	Das Modell der Atemwegs-Sensibilisierung	73
3.1.1.1	Einführung	73
3.1.1.2	Protokolle	74
3.1.1.3	Ergebnisse	75
3.1.2	CD8 Depletion vor Atemwegs-Sensibilisierung	76
3.1.2.1	Einführung	76
3.1.2.2	Protokolle	77
3.1.3	Anti-IL-5 Antikörper vor Atemwegs-Sensibilisierung	79
3.1.3.1	Einführung	79
3.1.3.2	Protokolle	80
3.2	Ergebnisse im Modell der passiven Sensibilisierung	81
3.2.1	Passive Sensibilisierung mit IgE und IgG1	82
3.2.1.1	Einführung	82
3.2.1.2	Protokolle	83
3.2.2	Passive Sensibilisierung von Nacktmäusen	84
3.2.2.1	Einführung	84
3.2.2.2	Protokolle	85
3.2.3	Passive Sensibilisierung von B-Zell-defizienten-Mäusen	86
3.2.3.1	Einführung	86
3.2.3.2	Protokolle	87
3.3	Ergebnisse im Modell der systemischen Sensibilisierung	88
3.3.1	Das Modell der systemischen Sensibilisierung	89
3.3.1.1	Einführung	89
3.3.1.2	Protokolle	90
3.3.2	Systemische Sensibilisierung von B-Zell-defizienten Mäusen	91
3.3.2.1	Einführung	91

3.3.2.2	Protokolle	91
3.3.3	Systemische Sensibilisierung von Mastzell-defizienten Mäusen	92
3.3.3.1	Einführung	92
3.3.3.2	Protokolle	92
3.3.4	Systemische Sensibilisierung von Zytokin-defizienten Mäusen	93
3.3.4.1	Einführung	93
3.3.4.2	Protokolle	94
3.3.5	Anti-IL-5 und anti-IgE Antikörper Behandlung	95
3.3.5.1	Einführung	95
3.3.5.2	Protokolle	96
4.	Kapitel Beantwortung der Fragen und Diskussion	97
4.1	Wie unterscheiden sich <i>unterschiedliche Modelle</i> der Sensibilisierung hinsichtlich IgE-Produktion, eosinophiler Entzündung und Entwicklung von AHR?	98
4.2	Welche Bedeutung haben <i>B-Zellen</i> , allergen-spezifische <i>IgE</i> -Produktion und IgE-vermittelte <i>Mastzell</i> -Aktivierung für die Entwicklung von Atemwegs-Entzündung und AHR?	99
4.3	Welche Bedeutung spielen <i>T-Zellen</i> und <i>T-Zell-Zytokine</i> für die Entwicklung von Atemwegs-Entzündung und AHR?	100
4.4	Welche Bedeutung haben <i>IL-5</i> und <i>IL-5</i> -vermittelte <i>eosinophile</i> Atemwegs-Infiltration für die Entwicklung von Atemwegs-Entzündung und AHR?	101
4.5	Welche möglichen <i>therapeutischen Ansätze</i> können daraus gefolgert werden?	102
4.6	Aussichten	103
5.	Zusammenfassung	105
6.	Literaturverzeichnis	108
7.	Danksagung	126
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	128

I. Liste der Publikationen

Dieser Arbeit liegen folgende Publikationen zugrunde:

- 1 Hamelmann E, Oshiba A, Bradley K, Loader J, Larsen G, Potter T, Gelfand E. REQUIREMENT FOR CD8 T CELLS IN THE DEVELOPMENT OF AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS IN A MURINE MODEL OF AIRWAY SENSITIZATION. *J. Exp. Med.* 1996; 183:1719-1730.
- 2 Hamelmann E, Oshiba A, Coffman R, Lee J, Larsen K, Gelfand EW. ANTI-INTERLEUKIN-5 ANTIBODY PREVENTS AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS IN A MURINE MODEL OF AIRWAY SENSITIZATION. *Am. J. Crit. Care Resp. Med.* 1997; 155: 819-825.
- 3 Schwarze J., Hamelmann E, KL Bradley, K Takeda, EW Gelfand. RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS INFECTION RESULTS IN AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS AND ENHANCED AIRWAY SENSITIZATION TO ALLERGEN. *J. Clin. Invest.* 1997; 100: 226-233.
- 4 Oshiba A, Hamelmann E, Takeda K, Bradley K, Loader J, Larsen G, and Erwin W. Gelfand. PASSIVE TRANSFER OF IMMEDIATE HYPERSENSITIVITY AND AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS BY ALLERGEN-SPECIFIC MONOCLONAL IGE AND IGG1 BUT NOT IGG2A OR IGG3 ANTIBODIES IN MICE. *J. Clin. Invest.* 1996; 97 (6): 1398-1408.
- 5 Hamelmann E, Oshiba A, Schwarze J, Bradley K, Loader J, Larsen G, Potter T, Gelfand EW. ALLERGEN-SPECIFIC IgE AND IL-5 ARE ESSENTIAL FOR THE DEVELOPMENT OF AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 1997; 16: 674-682.
- 6 Hamelmann E, Vella AT, Oshiba A, Marrack P, Gelfand EW. ALLERGIC AIRWAY SENSITIZATION INDUCES T-CELL ACTIVATION BUT NOT AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS IN B-CELL DEFICIENT MICE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94:1350-1355.

- 7 **Hamelmann E.**, J. Schwarze, K. Takeda, A. Oshiba, G.L. Larsen, C.G. Irvin, E.W. Gelfand. NONINVASIVE MEASUREMENT OF AIRWAY RESPONSIVENESS IN ALLERGIC MICE USING BAROMETRIC PLETHYSMOGRAPHY. *Am. J. Crit. Care Resp. Med.* 1997;156:766-775.

- 8 **Hamelmann E.**, Vella AT, Kappler J, Marrack P, Gelfand EW. DEVELOPMENT OF EOSINOPHILIC AIRWAY INFLAMMATION AND AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS REQUIRES INTERLEUKIN-5 BUT NOT IMMUNOGLOBULIN E OR B LYMPHOCYTES [SEE COMMENTS]. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999 Oct 1;21(4):480-489.

- 9 Takeda K, **Hamelmann E**, Joetham A, Shultz L, Irvin C, Gelfand EW. DEVELOPMENT OF AIRWAY EOSINOPHILIA AND AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS IN ALLERGEN-SENSITIZED MAST CELL DEFICIENT MICE. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 449-454.

- 10 **Hamelmann E**, Takeda K, Haczku A, Cieslewicz G, Shultz LD, Hamid QA, Xing Z, Gauldie J, and Gelfand EW. IL-5 BUT NOT IGE RECONSTITUTES AIRWAY INFLAMMATION AND HYPERRESPONSIVENESS IN IL-4 DEFICIENT MICE. *Am.J Respir.Cell Mol.Biol.* 2000;23:327-334.

- 11 **Hamelmann E**, Cieslewicz G, Schwarze J, Ishizuka T, Joetham A, Heusser C, Gelfand E. ANTI-INTERLEUKIN 5 BUT NOT ANTI-IMMUNOGLOBULIN E TREATMENT PREVENTS AIRWAY INFLAMMATION AND HYPERRESPONSIVENESS IN A MOUSE MODEL OF ALLERGIC SENSITIZATION. *Am. J. Crit. Care Resp. Med.* 1999;160: 934-941.

- 12 **Hamelmann E.** ZUR ENTSTEHUNG VON ATEMWEGS-ENTZÜNDUNG UND ATEMWEGS-HYPERREAKTIVITÄT: EINBLICKE AUS DEM ASTHMA MAUS-MODELL. *Pneumologie* 1999;53:307-312.

- 13 **Hamelmann E, Takeda K, Oshiba A, Gelfand EW.** ROLE OF IGE IN THE DEVELOPMENT OF ALLERGIC AIRWAY INFLAMMATION AND AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS-A MURINE MODEL. *Allergy*. 1999;54:297-305.
- 14 **Hamelmann E, Wahn U, Gelfand EW.** ROLE OF TH2 CYTOKINES IN THE DEVELOPMENT OF ALLERGEN-INDUCED AIRWAY INFLAMMATION AND HYPERRESPONSIVENESS. *Intl. Arch. Allergy Immunol* 1999;118:90-94.
- 15 **Hamelmann E, Gelfand EW.** ROLE OF IL-5 IN THE DEVELOPMENT OF ALLERGEN-INDUCED AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS. *Intl. Arch. Allergy Immunol* 1999;120:8-16.
- 16 **Hamelmann E and Gelfand EW.** IL-5 INDUCED AIRWAY EOSINOPHILIA - THE KEY TO ASTHMA ? *Immunol. Reviews* 2001;179:182-191.
- 17 **E Hamelmann.** Anti-IgE und Anti-IL-5 – neue therapeutische Konzepte für die Behandlung von Allergien. *Allergologie* 2000;23(12):585-588.
- 18 **Blümchen K., T. Kallinich, E Hamelmann.** ANTI-IL-5 THERAPY. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2001;1(3):433-453.
- 19 **Hamelmann E, Rolinck-Werninghaus C, Wahn U.** FROM IGE TO ANTI-IGE – WHERE DO WE STAND. *Allergy* 2002

II. Liste der Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
AF	Atemfrequenz
AHR	Atemwegs-Hyperreaktivität
AI	Atemwegs-Entzündung
AK	Antikörper
AM	Adhäsionsmolekül
AR	Atemwegs-Reaktivität
AZV	Atemzug-Volumen
B-Zellen	B (Bursa fabricii-abhängige) Lymphozyten
BA	Asthma bronchiale
BAL	Broncho-alveoläre Lavage
B10.BR	gezüchteter Mausstamm
BALB/c	gezüchteter Mausstamm
C57BL6	gezüchteter Mausstamm
CD	cluster of differentiation
Cy	Zytokin
Eo	Eosinophiler Granulozyt
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EFS	Elektrische Feldstimulation
EPO	eosinophile Peroxidase
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
ICH	(Immediate cutaneous hypersensitivity) Sofortreaktion der Haut
IFN	Interferon
HBSS	Hanks balanzierte Salzlösung (Hanks balanced salt solution)
hrs	Stunden
Ig	Immunoglobulin
IHC	Immunohistochemie
IL	Interleukin
in	intranasal
ip	intraperitoneal

ISH	in situ-Hybridisierung
iv	intravenös
MBP	Major basic protein der Eosinophilen
MCh	Metacholin
min	Minute
MNC	Mononukleäre Zellen
OA	Ovalbumin
PBLN	peribronchiale Lymphknoten
PE	Phytoerythrin
Penh	enhanced pause
PBS	Phosphate buffered saline
RL	Lungenwiderstand
SC	Milzzellen (spleen cell)
sec	Sekunden
T-Zellen	T-(Thymus-abhängige) Lymphozyten
Th	T-Helferzelle
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VLA	very late antigen
vs	versus
WBP	Ganzkörper-Plethysmographie (whole body plethysmograph)

III. Liste der Abbildungen

Nr	Abbildung	Seite
	Abbildung 1.1.1: Dosis-Wirkungs-Kurve bei Vorliegen von AHR	17
	Abbildung 1.2.1: Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen.	23
	Abbildung 1.2.2: Aktivierung von Mastzellen	28
	Abbildung 1.2.3: Adhäsion von Leukozyten	31
	Abbildung 1.2.4: Struktur von IgE	36
	Abbildung 1.2.5: VDJ-Rekombination der schweren Kette	37
	Abbildung 1.2.6: Isotypen-Wechsel (switch) zu IgE	38
	Abbildung 1.2.7: Regulation der IgE-Synthese	41
	Abbildung 1.2.8: Synopsis über die Entstehung von Atemwegs-Obstruktion, Atemwegs-Entzündung und AHR	43
	Abbildung 1.4.1: Hauptkomponenten bei der Entstehung von Asthma bronchiale	50
	Abbildung 2.2.1: Übersicht über Sensibilisierungs- und Provokationsprotokolle	59
	Abbildung 3.1.1: Protokoll der Atemwegs-Sensibilisierung	74
	Abbildung 3.1.2: Protokoll der CD8-Depletion.	78
	Abbildung 3.1.3: Protokoll der anti-IL-5 Antikörperbehandlung.	80
	Abbildung 3.2.1: Protokoll der passiven Sensibilisierung mit anti-OA Ig	83
	Abbildung 3.2.2: Protokoll der passiven Sensibilisierung von Nackmäusen	85
	Abbildung 3.2.3: Protokoll der passiven Sensibilisierung von B-Zell-defizienten Mäusen	87
	Abbildung 3.3.1: Protokoll der systemischen Sensibilisierung	90
	Abbildung 3.3.2: Protokoll der Zytokin-Rekonstitution	94
	Abbildung 3.3.3: Protokoll der anti-IgE und anti-IL-5 Behandlung	96
	Abbildung 4.6.1: Angriffspunkte für innovative Therapien bei Asthma bronchiale.	104

IV. Liste der Tabellen

Nr	Tabelle	Seite
	Tabelle 1.1.1: Mechanismen in der Entwicklung von AHR:	18
	Tabelle 1.1.2: Pathologie der asthmatischen Atemwegs-Entzündung.	21
	Tabelle 1.2.1: Entzündungs-Mediatoren in Asthma bronchiale.	22
	Tabelle 1.2.2: Histamin-Rezeptoren der Atemwege	24
	Tabelle 1.2.3: Eosinophile basische Proteine	25
	Tabelle 1.2.4: Zytokine in Asthma bronchiale	26
	Tabelle 1.2.5: Mastzell-Typen	27
	Tabelle 1.2.6: Endotheliale und leukozytäre Adhäsionsmoleküle.	32
	Tabelle 1.2.7: Chemokine für die Aktivierung von Leukozyten	33
	Tabelle 1.2.8: Einteilung von T-Zellen nach ihrem Zytokin-Profil	44
	Tabelle 4.6.1: Immunmodulierende anti-allergische Therapie	103

1. Kapitel

Einführung

1.1 Mechanismus der Atemwegs-Hyperreaktivität

Asthma bronchiale ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen, und die Anzahl der erkrankten Patienten (Prävalenz) und die Zahl der Neuerkrankungen (Inzidenz) sind noch immer zunehmend (1,7). Asthma bronchiale wird durch drei kardinale Faktoren definiert (8, 9):

- 1 Generalisierte, reversible *Atemwegs-Obstruktion*;
- 2 Atemwegs-Entzündung;
- 3 Atemwegs-Hyperreaktivität.

Atemwegs-Obstruktion nach z.B. Allergen-Kontakt, Kälteexposition oder bei Belastung führt zu dem klinischen Phänomen des Giemen (englisch etwa “wheezing”). Unter dem Begriff der *Atemwegs-Hyperreaktivität* (AHR) versteht man die vermehrte Irritabilität der Atemwege, die zur Konstriktion auf unspezifische Stimuli führt und damit Voraussetzung auch der Atemwegs-Obstruktion darstellt. Beiden Phänomenen zugrunde liegt eine (chronische) *Entzündung* der Atemwege (Atemwegs-Inflammation, AI) mit zellulärer Infiltration und Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren.

In dieser Arbeit werden Untersuchungen zur Pathophysiologie von AHR und dem Zusammenhang von AI und AHR an einem Maus-Modell von Asthma bronchiale dargestellt. Schwerpunkt der Studien sind Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen allergen-induzierter Antikörperproduktion einerseits und der durch T-Lymphozyten-Botenstoffen (Zytokine) initialisierten zellulären Infiltration der Atemwege andererseits bei der Ausbildung von AI und AHR.

1.1.1 Definition von AHR

Die Atemwegs-Reaktivität oder -Reagibilität (AR) ist definiert als der Grad, indem die Atemwege auf unspezifische Stimuli mit Konstriktion reagieren (10). Eine normal ausgeprägte AR ist durchaus als physiologischer Schutzmechanismus zu verstehen, der einerseits die Ventilation den derzeitigen Perfusionsverhältnissen anpaßt und andererseits das Lungengewebe vom Eindringen toxischer Substanzen

weitestgehend möglich abschirmen soll. Als AHR kann also die gesteigerte AR über dieses normale, gesunde Maß verstanden werden. Zur Bestimmung von AHR bedient man sich der Messung der Lungenfunktion nach Provokation der Atemwege mit unspezifischen Stimuli (11.13). Diese Stimulation kann vermittelt werden durch pharmakologische Irritantien wie Metacholin (MCh), Histamin, Serotonin, Bradykinin oder durch physikalische Reizung wie Anstrengung, Hyperventilation oder kalter Luft. Zur klinischen Bestimmung von AR werden zumeist Stimulationen mit MCh oder Histamin verwandt, die über Inhalation verabreicht werden. Bei asthmatischen Patienten mit AHR wird diese Form der Messung einerseits eine erleichterte (Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve) und andererseits eine vermehrte Konstriktion der Atemwege (Höhe des Maximalwertes der Kurve, fehlende Plateau-Phase bei hohen Konzentrationen) ergeben (10). Zu Zwecken der Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Lungenfunktionsmessung wird zumeist ein bestimmter Punkt der Dosis-Wirkungs-Kurve angegeben, nämlich die Konzentration des Stimulus (Dosis), bei der die forcierte Expiration in der ersten sec (FEV_1) auf 20% des Ausgangswertes (PC_{20}) ohne Stimulation gefallen ist (Wirkung) (Abb. 1.1.1).

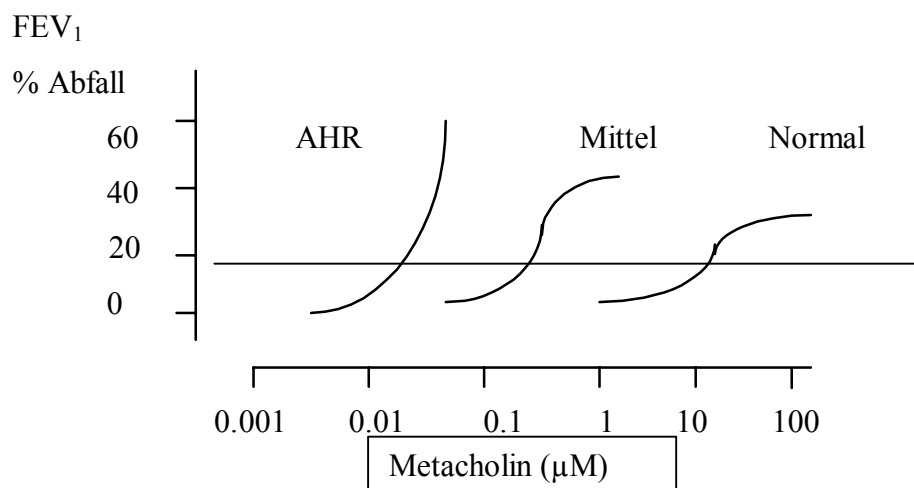


Abbildung 1.1.1: Dosis-Wirkungs-Kurve bei Vorliegen von AHR

1.1.2 Mechanismus der Atemwegs-Hyperreaktivität

Der genaue Pathomechanismus der Entwicklung von AHR ist unbekannt. Mehrere mögliche Ursachen können jedoch in der Ausbildung von AHR eine Rolle spielen und möglicherweise additiv wirken (Tabelle 1.1.1).

Tabelle 1.1.1: Mechanismen in der Entwicklung von AHR:

Ursache	Mechanismus
1. Muskuläre Abnormalität	1.1 Hypertrophie, Hyperplasie
2. Strukturelle Abnormalität	2.1 Atemwegs-Durchmesser 2.2 Atemwegs-Wandstärke 2.3 Atemwegs-Permeabilität
3. Neurologische Abnormalität	3.1 β -adrenerge Blockade 3.2 α -adrenerge Übererregbarkeit 3.3 Cholinerge Übererregbarkeit 3.4 iNANC/ eNANC Ungleichgewicht
4. Atemwegs-Entzündung	4.1 Inflammation, AHR

1.1.2.1 Abnormalität der Atemwegs-Muskulatur

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass die isolierte Atemwegsmuskulatur von Patienten mit Asthma bronchiale *in vitro* gesteigerte AR aufwies (14.16). Es ist daher denkbar, dass eine funktionelle oder strukturelle Abnormalität des Muskels selbst, möglicherweise durch inflammatorische Prozesse hervorgerufen, zur Entwicklung von AHR beiträgt.

1.1.2.2 Strukturelle Abnormitäten

AHR zeichnet sich durch erhöhte Werte für den Atemwegswiderstand aus. Dieser ist nach dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz bei angenommener laminarer Strömung in einer Röhre invers proportional zur vierten Potenz des Radius der Röhre (siehe 2.2.9.2). Das bedeutet, dass das Kaliber der Atemwege im besonderen Umfang die Höhe des Atemwegswiderstandes beeinflusst. Es wäre demnach denkbar, dass AHR auf einem verminderten Ausgangs-Durchmesser der (kleinen) Atemwege basiert (17). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei Asthma bronchiale die

Ausgangswerte für FEV₁ (proportional zum Widerstand) und Werte für PC₂₀ nach Histamin- oder MCh-Stimulation (proportional zur AR) nicht gut korrelierten, und dass bei asthmatischen Patienten mit milder oder moderater AHR die Atemwege keine verkleinerten Durchmesser aufwiesen (10).

In morphometrischen Analysen der Atemwege von asthmatischen Patienten wurde eine erhöhte Zellularität und vermehrter Flüssigkeitsgehalt in den Wänden der Atemwege nachgewiesen. Diese erhöhte Dicke der Atemwegs-Wand könnte als eigenständiger Faktor zur Erhöhung der AR beitragen (18).

Ultrastrukturelle Analysen von Atemwegen asthmatischer Patienten ergaben, dass sog. "tight junctions", Verschlußstücke zwischen Zellen an endothelialen und epithelialen Barrieren, verlorengegangen waren. Dies könnte eine erhöhte Permeabilität der Atemwegs-Wand und damit eine bessere Bioverfügbarkeit der inhalierten Stimuli (MCh) zur Folge haben (19). Im Vergleich mit den Atemwegen von Rauchern wurde jedoch gefunden, dass letztere zwar deutlich erhöhte Permeabilität aber keine AHR aufweisen, während Asthmatiker AHR ohne Zeichen von Permeabilitätserhöhung (gemessen durch radioaktiv markierte Tracer) erkennen ließen. Das bedeutet, dass Permeabilitätserhöhungen der Atemwege bei Asthma bronchiale nicht die grundlegende Ursache von AHR darstellen können, wohl aber eine Begleiterscheinung bei Atemwegs-Entzündung darstellt (20).

1.1.2.3 Neurologische Abnormitäten

Die Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege steht unter komplexer neuronaler Kontrolle. Viele der Stimuli, die zur Bestimmung der AR verwandt werden, setzen an den entsprechenden Nervenrezeptoren an. Ursprünglich wurde nur das klassische *autonome Nervensystem* beschrieben, welches durch β -adrenerge (sympathische) Inhibition und α -adrenerge sowie cholinerge (parasympathische) Exzitation den Kontraktionszustand der glatten Muskulatur kontrolliert. Ursprünglich wurde das Ungleichgewicht dieser autonomen Innervation mit vorherrschendem parasympathischem Tonus aufgrund eines β -adrenergen Defekts bzw. einer Blockade für das Auftreten von AHR verantwortlich gemacht. Unterstützt wurde diese These durch Beobachtungen, die in Gewebeproben asthmatischer Patienten eine verminderte Ansprechbarkeit auf β -adrenerge Substanzen nachwiesen (21). Allerdings konnte eine entsprechende Reduktion in der Antwort auch in nicht-asthmatischen Patienten

induziert werden, die längere Zeit mit β -Sympathomimetika behandelt worden waren (22). Pharmakologische Blockade der β -adrenergen Innervation erhöht zwar den Grad der AR bei asthmatischen Patienten, verursacht jedoch keine entsprechende Erhöhung bei Gesunden, so dass ein Defekt des β -adrenergen Systems *per se* wohl nicht Ursache von AHR sein kann (23, 24).

Im Vergleich hierzu ist die Bedeutung der α -adrenergen Exzitation der Atemwegs-Muskulatur als gering zu werten, wenn auch eine erhöhte Reaktivität auf α -adrenerge Stimulation bei Asthmatikern zu beobachten ist (25).

Wesentlich wichtiger erscheint die cholinerge Kontrolle von Muskeltonus und Sekretion in den Atemwegen. Viele Stimuli von Bronchokonstriktion greifen direkt an der parasympathischen Innervation an, und Parasympatolytika wie Atropin blockieren zumindest teilweise die Bronchokonstriktion. Es wurde vermutet, dass die erleichterte Erregbarkeit des afferenten Vagusnervens und seines Rezeptors die Ursache der cholinergen Überreaktivität bei Asthmatikern darstellt, möglicherweise aufgrund inflammatorischer Irritation oder Schädigung. In anderen Überlegungen wurde die vermehrte efferente Erregung der Muskulatur für die Entwicklung von AHR verantwortlich gemacht (cholinerge AHR). Da die Atemwege von Asthmatikern auch nach Stimulation mit nicht-cholinergen Substanzen wie Histamin überempfindlich reagieren, kann die cholinerge Überreaktivität das Auftreten von AHR jedoch nicht vollständig erklären (26, 27).

In jüngerer Zeit ist ein noch nicht vollständig verstandener, zusätzlicher Teil des autonomen Nervensystems beschrieben worden, der nicht-adrenerge-nicht-cholinerge inhibitorische (NANCI) und exzitatorische (NANCe) Fasern beinhaltet. Ein möglicherweise durch Entzündung hervorgerufener Defekt in diesem Abschnitt der neuronalen Kontrolle der Atemwegs-Muskulatur könnte jedoch Ursache einer gesteigerten cholinergen Innervation und eines erhöhten Muskeltonus sein (28,31).

1.1.3 Atemwegs-Entzündung und Atemwegs-Hyperreaktivität

Einer der kardinalen Faktoren in der Pathogenese von Asthma bronchiale stellt die Inflammation der Atemwege dar. Erst im letzten Jahrzehnt hat sich das Verständnis der pathophysiologischen Befunde von asthmatischen Patienten dahingehend verändert, dass die Erkrankung als chronische Entzündung der Atemwege aufgefaßt wurde. Entsprechend erleben wir eine Verschiebung der

therapeutischen Intervention weg von nur symptomatischen Ansätzen (Bronchodilatation) und hin zur bereitwilligeren anti-inflammatorischen Behandlung (z.B. durch Steroide).

Während die einzelnen Faktoren, die an der Entzündungsreaktion beteiligt sind, grundsätzlich für die Abwehr von toxischen Organismen oder Stoffen notwendig und daher zur Erhaltung von Funktion und Struktur der Atemwege erforderlich sind, stellt die asthmatische Entzündung eine überschießende Reaktion auf *per se* unschädliche Umweltstoffe dar. Hierdurch kommt es zu einer Reihe von pathophysiologischen Vorgängen, die funktionelle (AHR, Obstruktion) und später auch strukturelle Veränderungen nach sich ziehen (Tabelle 1.1.1) (32).

Die Atemwegs-Entzündung spielt daher die wohl maßgebliche Rolle bei der Ausbildung von AHR durch Induktion von strukturellen, neurologischen und anderen funktionellen Veränderungen und soll im folgenden Abschnitt ausführlich besprochen werden.

Tabelle 1.1.2: Pathologie der asthmatischen Atemwegs-Entzündung.

Pathophysiologischer Vorgang	Strukturelle Folge
1. Freisetzung von Mediatoren	
1.1 Zellwand (Arachidonsäure-Derivate)	Zerstörung von Epithel und subepithelialen Strukturen
1.2 Plasma (Komplement, Kinine, Gerinnung)	
1.3 Gewebe (Nervenendigungen)	
2. Gefäßreaktion	
2.1 Zunahme des Blutstroms	Hyperämie
2.2 Exsudation	Ödem
3. Zelluläre Antwort	
3.1 Infiltration	Leukozytäres Infiltrat
3.2 Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren	Epitheliale Zerstörung
4. Reparatur	Goblet-Zell-Metaplasie
4.1 Stimulation des Epithels	Basalmembran-Verdickung
4.2 Stimulation des subepithelialen Bindegewebes	Muskuläre Hyperplasie

1.2 Allergische Entzündung in Asthma bronchiale

Bei der asthmatischen Entzündung der Atemwege können humorale (1.2.1) und zelluläre Komponenten (1.2.2) der Inflammation unterschieden werden. Eine besondere Rolle kommt den T-Lymphozyten als Haupt-Regulationszellen der allergischen Reaktion zu (1.2.3).

1.2.1 Humorale Faktoren

In der Pathogenese von Asthma bronchiale spielen eine Reihe von inflammatorischen Mediatoren eine mehr oder weniger gut definierte Rolle. Es handelt sich entweder um Zellwandbestandteile (1.2.1.1), Inhaltsstoffe von präformierten Granula (1.2.1.2) oder um *de novo* synthetisierte Stoffe (1.2.1.3). Sie können zu Bronchokonstriktion, Hypersekretion der Drüsenzellen, chemotaktischer Induktion der Infiltration weiterer Entzündungszellen und schließlich zu AHR führen (33) (Tabelle 1.2.1).

Tabelle 1.2.1: Entzündungs-Mediatoren in Asthma bronchiale.

	Konstriktion	Sekretion	Chemotaxis	AHR
Histamin	+	+	+	-
PG D₂, F_{2α}	++	+	?	+
PG E₂	-	+	+	-
LTB₄	-	-	++	±
LTC₄, D₄, E₄	++	++	?	±
PAF	++	+	++	++
Bk	+	+	-	-
SP	+	++	±	-
C'	+	+	++	-
Serotonin	±	?	-	-

PG: Prostaglandin; LT: Leukotrien; PAF: platelet activating factor; BK: Bradykinin; SP: substance P; C': Komplement.

1.2.1.1 Membranabkömmlinge

Von wandständigen Phospholipiden wird nach Aktivierung durch Phospholipase A2 Arachidonsäure (AA) freigesetzt, welche enzymatisch entweder durch Zycloxygenase in die Prostaglandine (PG), oder durch Lipoxygenase in die Leukotriene (LT) metabolisiert wird.

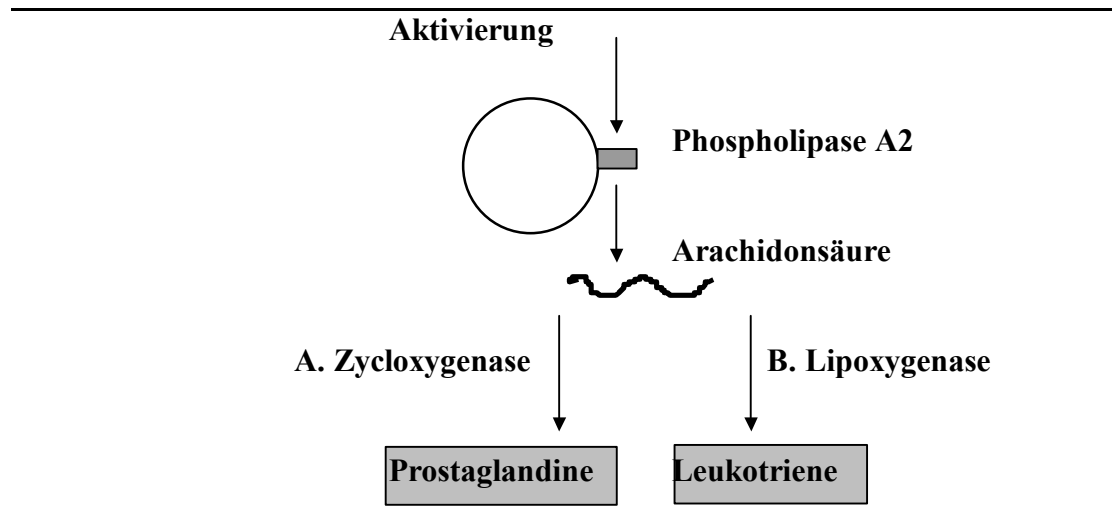


Abbildung 1.2.1: Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen.

A. Zycloxygenase-Produkte

Aus AA werden durch die Zycloxygenase PG und Thromboxan (Tx) synthetisiert. PGE₂ und D₂ sind Bronchokonstriktoren, wohingegen PGE₂ dilatativ auf die Atemwege wirkt. PGF₂ und E₂ induzieren Husten und Hypersekretion von Schleimdrüsen der Atemwege; Tx fördert Ödembildung durch Extravasation und potenziert die Bronchokonstriktion auf Histamin. Klinische Studien, in denen neue PG und Tx-Inhibitoren als potentielle therapeutische Intervention eingesetzt wurden, ergaben eher enttäuschende Ergebnisse, so dass den Zycloxygenase-Produkten zumindest nicht die Schlüsselrolle in der Pathogenese von Asthma bronchiale zugeschrieben werden kann (33, 34).

B. Lipoxygenase-Produkte

Aus AA werden durch die Lipoxygenase LT synthetisiert. LTC₄ und D₄ sind sehr potente Bronchokonstriktoren und fördern die Schleimproduktion in den Atemwegen. LTC₄, D₄ und E₄ wirken beim Meerschweinchen ödemfördernd, LTB₄

wirkt *in vitro* chemotaktisch auf Neutrophile, weniger auf Eosinophile. LTE₄ wirkt additiv auf die Bronchokonstriktion mit Histamin. Inhibitoren von LTD₄ wurden in klinischen Versuchen erfolgreich eingesetzt und wirken besonders bei Anstrengungs-induziertem und allergischem Asthma bronchiale steroid-sparend (33, 34).

1.2.1.2 Zell-Granula

A. Histamin

Histamin ist der “klassische” Mediator in der Pathogenese von Asthma bronchiale und vermittelt die sog. allergische Sofortreaktion. Histamin kann seine Wirkung über drei verschiedene Rezeptoren vermitteln (35, 36):

Tabelle 1.2.2: Histamin-Rezeptoren der Atemwege

Rezeptor	Wirkung
H1	Bronchokonstriktion, Vasodilatation, Permeabilitätserhöhung
H2	Bronchialdilatation, Schleimsekretion
H3	Modulation von cholinergen und sensorischen Nerven

Trotz dieser eindeutig beschriebenen Effekte von Histamin auf die Atemwege konnten Anti-Histaminika in der Behandlung von Atemwegs-Entzündung und AHR nicht überzeugen und spielen daher in der Therapie von Asthma bronchiale nur eine untergeordnete Rolle (37).

B. Eosinophile Granula

Die eosinophilen Zellen sind der Hauptbestandteil des allergischen Infiltrates der Atemwege. In ihren Granula sind sog. basische Proteine gespeichert. Es können mehrere verschiedene Proteine unterschieden werden (Tab. 1.2.3) (38, 39):

Tabelle 1.2.3: Eosinophile basische Proteine

Protein	Wirkung
MBP	Toxisch für bronchiale Epithelzellen, Bronchokonstriktion, AHR in Primaten, Histaminliberator.
EPO	Toxisch für Epithelzellen und Pneumozyten, Bronchokonstriktion, LT-Aktivierung.
ECP	Toxisch für tracheales Epithel, Histaminliberator.
EDN	keine Zell-Toxizität.

(MBP: major basic protein; EPO: eosinophil peroxidase; ECP eosinophil cationic protein; EDN: eosinophil-derived neurotoxin)

Die basischen Proteine können die Atemwege direkt angreifen durch Schädigung des Epithels (39, 40). MBP kann direkt AHR induzieren (41.43) und blockiert M2-Muskarinrezeptoren von cholinergen Nerven in der Lunge (44). In einem Primatenmodell wurde durch die Applikation von MBP Atemwegs-Obstruktion ausgelöst (45). Außerdem konnte bei asthmatischen Patienten die Korrelation zwischen MBP-Freisetzung und AHR aufgezeigt werden (46). Antagonisten der basischen Proteine sind bislang noch nicht auf ihre mögliche Wirkung in der Behandlung von Asthma bronchiale untersucht worden.

1.2.1.3 Zytokine

Zytokine sind lösliche Botenstoffe zwischen Zellen, die ihre Wirkung über Rezeptoren auf den Zelloberflächen der Zielzellen vermitteln und so zur Regulierung der Abwehrfunktion der Zellen des Immunsystems beitragen. Die meisten Zytokine weisen eine Bandbreite von Funktionen auf, die sie auf verschiedenen Zielzellen ausüben können (funktionelle Vielfalt des Zytokin-Systems). Weiter existieren funktionell sehr ähnliche Zytokine, die sich in ihrer Wirkung auf die gleichen Zielzellen addieren oder sogar substituieren können (Redundanz des Zytokin-Systems).

In der Pathogenese von allergischen Erkrankungen und von Asthma bronchiale sind eine Vielzahl von Zytokinen beschrieben worden, die eine mehr oder weniger wichtige Rolle spielen. Es ist mittlerweile allgemein akzeptiert, dass ein

Ungleichgewicht in der Produktion der Zytokine zugunsten der sog. Th2-Zytokine (siehe Kapitel 1.2.3.1) maßgeblich an der Entwicklung allergischer Erkrankungen wie Asthma bronchiale beteiligt ist. Tabelle 1.2.2 gibt einen Überblick über die wichtigsten in der Pathogenese von Asthma bronchiale involvierten Zytokine.

Tabelle 1.2.4: Zytokine in Asthma bronchiale

Zytokin	Herkunft	Wirkung
IL-1	viele	Aktivierung von T-Zellen, Makrophagen, Eos.
IL-2	T-Zellen	Differenzierung und Aktivierung von T-Zellen.
IL-3	T-Zellen, MC, Eos	Differenzierung und Aktivierung von PMN, Eos.
IL-4	T-Zellen, MC	B-Zell-Differenzierung: IgE-Isotypen-Wechsel, T-Zell-Differenzierung: Th2-Aktivierung. Adhäsion: Aktivierung von VCAM-1 Expression.
IL-5	T-Zellen, MC, Eos	Eos: Differenzierung, Reifung, Überleben, Chemotaxis, Adhäsion.
IL-6	viele	unterstützt IL-1.
IL-8	T-Zellen, Monozyten	Chemotaxis von Neutrophilen und T-Zellen.
IL-10	T-Zellen, Monozyten	Inhibition von Th1-Zytokin-Produktion.
IL-12	Monozyten, Makrophagen	T-Zell-Differenzierung: Inhibition von Th2, Aktivierung von IFN, Inhibition von IgE.
IL-13	T-Zellen	B-Zell-Differenzierung: unterstützt IL-4 bei IgE-Isotypen-Wechsel. Schleimproduktion. AHR.
IFN-γ	T-Zellen	B-Zell-Differenzierung: IgG2a/ IgG4-Isotypen-Wechsel, inhibiert IgE Produktion. T-Zell-Differenzierung: Th1-Aktivierung, inhibiert Th2-Differenzierung.
GM-CSF	T-Zellen, MC, Eos	wie IL-3
TGF-β	Monozyten, Makrophagen	Inhibition der Th2-Zytokin-Produktion.

1.2.2 Entzündungs-Zellen

In der Pathogenese von Asthma bronchiale kommt es zu einer chronischen Atemwegs-Entzündung mit leukozytärer Infiltration. Die wichtigsten Zelltypen sollen im folgenden besprochen werden.

1.2.2.1 Mastzellen

MC entspringen aus Knochenmark (KM)-Vorläufer-Zellen und zeichnen sich durch tiefblaue (basophile) Granula aus. Nach Inhalt dieser Granula und Vorkommen der MC werden zwei Typen unterschieden (Tab. 1.2.5): Mucosale MC (MMC) und Bindegewebs-MC (connective tissue MC, CTMC) sowie die Basophilen Zellen im peripheren Blut (47.49).

Tabelle 1.2.5: Mastzell-Typen

<i>Typ:</i>	MMC	CTMC	Basophile
<i>Lokalisation:</i>	Mukosa, Lunge, Epitheloberfläche	Bindegewebe, Haut	Peripheres Blut
<i>Reifung:</i>	KM, T-Zell-abhängig	KM, T-Zell-unabhängig	KM, T-Zell-abhängig
<i>Lebensdauer:</i>	Wochen-Monate	Wochen-Monate	Tage
<i>Tryptase:</i>	+	+	+
<i>Chymase:</i>	+	-	+
<i>LTC4:</i>	++	(+)	++
<i>PGD2:</i>	++	+	-

Das herausragende funktionelle Merkmal von allen MC ist die Expression des hochaffinen Rezeptors für IgE (FcεRI) (50, 51). Durch Verknüpfung (“bridging”) mindestens zweier Rezeptor-gebundener IgE-Moleküle durch Bindung von spezifischem Allergen kommt es zur Aktivierung der MC. Der gleiche Effekt kann durch anaphylaktogene anti-IgE- oder anti-FcεRI-Antikörper erreicht werden. Die Aktivierung erfolgt durch Anreicherung von zyklischem Adenosin-Monophosphat

(cAMP), Methylierung membranständiger Phospholipide, Eindringen von Ca^{++} in die Zellen und schließlich einer Kaskade von Protein-Kinasen (52, 53). Hierdurch kommt es einerseits zur Degranulierung und Freisetzung präformierter Mediatoren (Histamin, Tryptase) und andererseits zur *de novo*-Synthese von Mediatoren (PG, LT) (Abbildung 1.2.2).

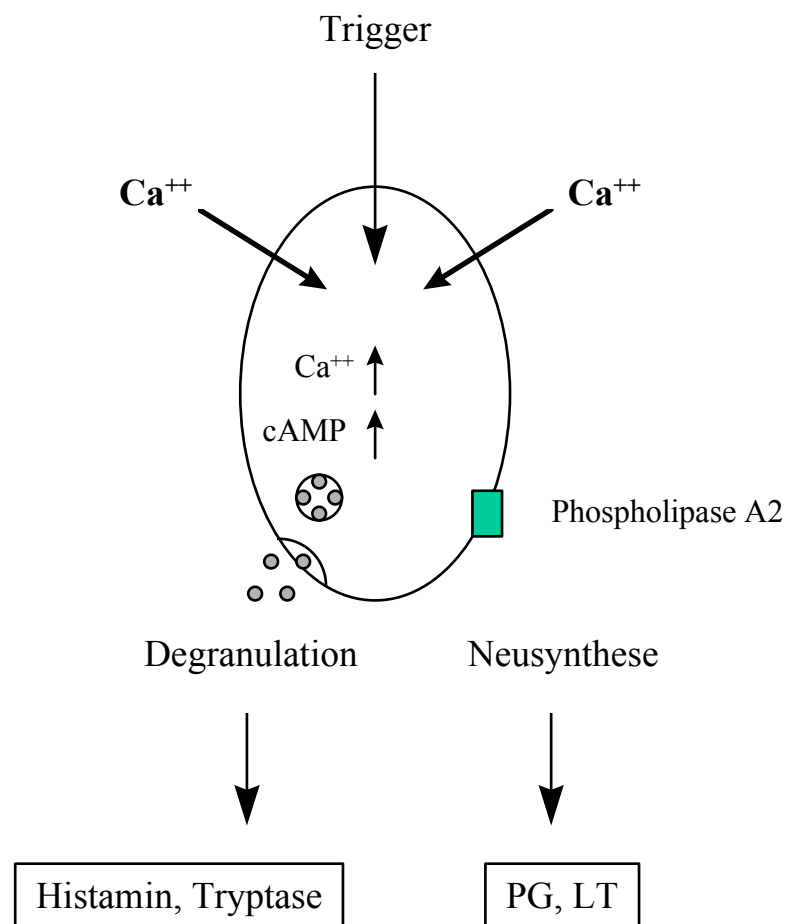


Abbildung 1.2.2: Aktivierung von Mastzellen

Mastzellen und Asthma

MMC sind bei allergischen Patienten in den Lungen und der Nasenschleimhaut signifikant vermehrt anzutreffen (54,57). Kontinuierliche MC-Aktivierung bei asthmatischen Patienten konnte durch Zeichen von degranulierten MC in bronchialen Biopsaten nachgewiesen werden. Darauf sind auch die erhöhten Konzentrationen von Histamin und Tryptase, Degranulierungs-Produkten von MC, in der BAL-Flüssigkeit von Asthma-Patienten zurückzuführen (58). Histamin ist der Mediator der klassischen allergischen Sofortreaktion (Typ I nach Coombs), und die

neugebildeten Mediatoren, PG und LT, unterstützen Bronchokonstriktion, Mukus-Produktion und Ödembildung (siehe 1.2.1.1 und 1.2.1.2).

Die Rolle von MC bei der Entwicklung von chronischer Atemwegs-Entzündung und AHR bei Asthma bronchiale ist dagegen nicht völlig geklärt. Erst in jüngerer Zeit wurde nachgewiesen, dass neben T-Zellen auch MC in der Lage sind, mehrere verschiedene Zytokine wie IL-3, IL-4, IL-5 und IL-6 zu produzieren (59.62). Es ist daher gut möglich, dass die frühe Aktivierung von MC durch Allergen das erste lokale Signal in einer Kaskade ist, die letztlich zur Ausbildung von chronischer Entzündung und AHR führt. Die lokale Produktion von IL-4 wäre demnach ein Trigger zur Ausbildung einer Th2-Antwort (siehe 1.2.3.1) und lokaler IgE-Produktion (siehe 1.2.3.2), und die MC der Initiator der frühen (EAR) und späten asthmatischen Reaktion (LAR).

Therapeutisch wird dies umgesetzt mit dem Einsatz von Chromoglycinsäure, welche membranstabilisierend und daher anti-degranulativ auf MC wirkt. Allerdings konnten dieses und ähnlich wirkende Präparate die Entwicklung von chronischer Atemwegs-Entzündung und AHR nicht verhindern, so dass die Bedeutung der MC in der Pathogenese der LAR wohl begrenzt ist (63.65).

1.2.2.2 Eosinophile Zellen

Eos sind nicht-teilungsfähige polymorphkernige Leukozyten, die sich durch rote (eosinophile), dicht gepackte Granula auszeichnen. Sie können als die wesentlichen Effektorzellen der allergischen Entzündung angesehen werden. Eos entwickeln sich aus KM-Vorläuferzellen unter dem Einfluß bestimmter Zytokine, nämlich IL-3, GM-CSF und IL-5, deren Gene alle auf dem Chromosom 5 lokalisiert sind (66) . Dabei regulieren IL-3 und GM-CSF auch die Differenzierung anderer leukozytärer Vorläufer-Zellen, während IL-5 den einzigen spezifischen Faktor für die Entwicklung von Eos darstellt und ihre Reifung, Differenzierung, Überlebenszeit und Aktivierung fördert (67.69). In der Entwicklung durchlaufen Eos bestimmte Stufen von der multipotenten myeloiden Vorläuferzelle ($CD34^+$), zur mononukleären $CD34^+$ Zelle, zur zart-rosa nicht-granulierten Zelle und schließlich zur granulierten eosinophilen Zelle mit gelapptem Zellkern.

Reife Eos weisen primäre (MBP) und sekundäre Granula (EPO, ECP, EDN) auf (siehe 1.2.1.2 B), die nach Aktivierung basische Proteine freisetzen, welche eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von Asthma bronchiale spielen. Die

Aktivierung und die Überlebensdauer von Eos steht wieder unter der Regulation von Zytokinen, IL-3, IL-5, GM-CSF, die die zytotoxische Aktivität und Adhäsionsfähigkeit der Eos fördern und den Zelltod (Apoptose) im Gewebe verlangsamen (70.72). Weiter weisen Eos Rezeptoren für IgG und verschiedene niedrig- (Mac-2, CD23) sowie den hochaffinen Rezeptor für IgE (FcεRI) auf (73.80). Auch über die Bindung von spezifischen Ig an diese Rezeptoren kann es zu einer Aktivierung und Degranulation der Eos kommen.

Neben ihrer Fähigkeit zur Degranulation wurde in jüngerer Zeit beschrieben, dass Eos nach Aktivierung durch Zytokine oder Anaphylatoxine eine Reihe von Mediatoren *de novo* synthetisieren können. Hierzu zählen pro-inflammatorische Mediatoren wie PAF und LTC₄, Sauerstoffradikale und Zytokine wie IL-1, IL-5, IL-6, GM-CSF, TGF-α und -β (81.84). Diese Faktoren könnten zu einer Verstärkung der allergischen Entzündung und zu autokriner Aktivierung und Chemotaxis weiterer Eos führen, und damit die chronische Entzündung einhergehend mit Gewebeschädigung, Hypersekretion, Bronchokonstriktion und Ausbildung von AHR bei Asthma bronchiale erklären.

1.2.2.3 Leukozytäre Infiltration

Patienten mit Asthma bronchiale weisen eine signifikant erhöhte Anzahl von Eos in der BAL-Flüssigkeit und in bronchialen Biopsaten auf, und es besteht eine deutliche Korrelation zwischen der Anzahl an Eos und dem Schweregrad der Erkrankung (38, 56, 85.87). Obgleich auch Eos im peripheren Blut von Asthmatikern vermehrt anzutreffen sind, ist doch die Akkumulation in den Atemwegen, also dem primären Ort des Allergenkontaktes, eindeutig. Dies kann erklärt werden durch die gerichtete Lokomotion von leukozytären Zellen an den Ort der Entzündung (*homing*) mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen (88). Beim homing durchlaufen die Zellen verschiedene Stadien, in deren Verlauf es zu einer immer engeren Bindung der Leukozyten an epitheliale oder endotheliale Adhäsionsmoleküle kommt (siehe Abbildung 1.2.3). Nach initialem Fluß im peripheren Blut (*flow*) kommt es vermittelt durch sog. *Selektine* zu einem lockeren Entlanggleiten an der Epithelwand (*rolling*). Einige Zellen gelangen wieder in den freien Blutstrom, andere dagegen werden hierdurch soweit abgebremst, dass sie in einen engeren Kontakt zum Endothel treten können. Diese engere Bindung geht mit einer Aktivierung und Verformung der Leukozyten einher und wird durch die als *Integrine* bezeichneten AM vermittelt

(*Adhäsion*). Im letzten Schritt durchwandern die so gebundenen Zellen die Endothelsperre und werden durch extrazelluläre Matrix-Proteine auf der anderen Seite empfangen und weiter aktiviert (*Transmigration*) (89,91).

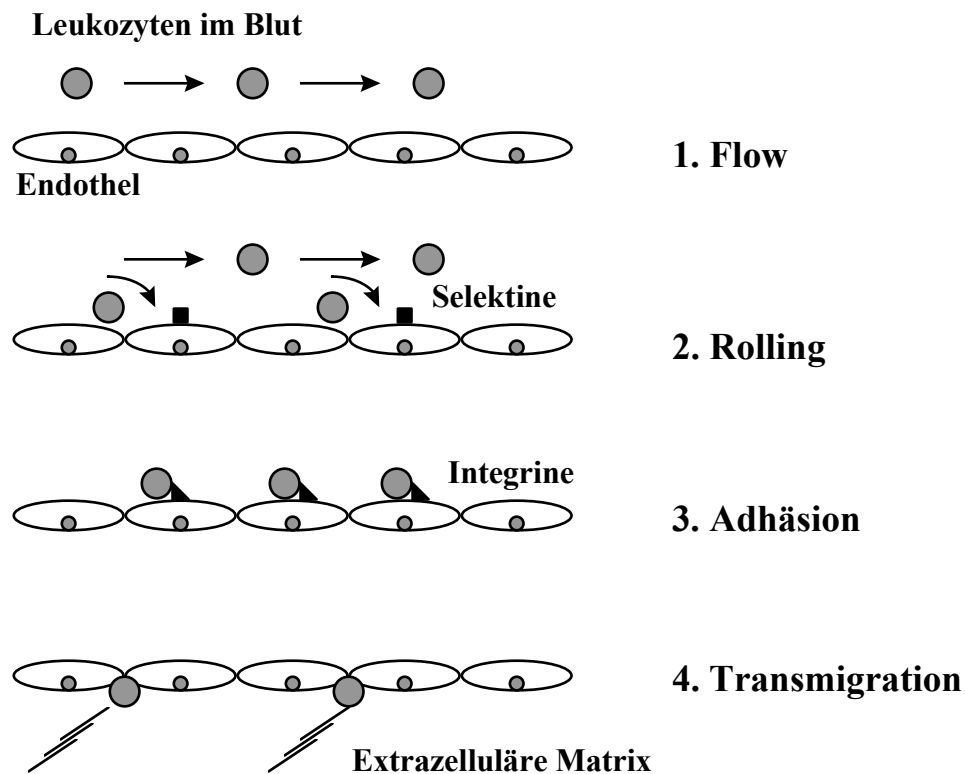


Abbildung 1.2.3: Adhäsion von Leukozyten

Die Basis einer gerichteten Infiltration stellt dabei die Zell-spezifische und regulierbare Expression der AM auf leukozytärer wie auf endothelialer/ epithelialer Seite dar (siehe Tabelle 1.2.6). Der selektive Einfluß verschiedener Mediatoren und Zytokine auf die Expression und das unterschiedliche Expressions-Muster von AM und entsprechenden Liganden auf den Zelloberflächen können erklären, warum unterschiedliche Effektorzellen verschieden stark im entzündeten Gewebe akkumulieren. Die Adhäsion von Eos wird durch die Interaktion zwischen endothelialelem VCAM-1 und VLA-4, welches auf Eos, nicht aber auf Neutrophilen exprimiert wird, vermittelt (92.95). Hiermit wird gewährleistet, dass bei der vermehrten Expression dieser beiden AM selektiv Eosinophile zum homing gelangen.

Die Expression von VCAM-1 wird unter anderem durch IL-4, einem kritischen Th2-Zytokin in der allergischen Sensibilisierung (siehe 1.2.3.1), hochreguliert (96). Hierdurch kann erklärt werden, warum es zur präferentiellen eosinophilen Atemwegs-Infiltration bei allergischem Asthma bronchiale kommt.

Tabelle 1.2.6: Endotheliale und leukozytäre Adhäsionsmoleküle.

<i>Endothel</i>	<i>Familie</i>	<i>Ligand</i>	<i>Familie</i>	<i>Leukozyt</i>
E-Selektin	Selektin	SL-x	CH	alle
P-Selektin	Selektin	SL-x ?	CH	alle
SL-x	CH	L-Selektin	Selektin	alle
ICAM-1	Ig	LFA-1, Mac-1	Integrin	alle
			Integrin	alle
ICAM-2	Ig	LFA-1	Integrin	alle
VCAM-1	Ig	VLA-4	Integrin	Eos, Ly

(E-: endothelial; P-: platelet; L-: Leukozyten-Selektin; SL-x: Sialysierter Lewis-x Faktor; ICAM: interstitial cell AM; VCAM: vascular cell AM; LFA: lymphocyte function-associated antigen; VLA: very late activation protein, Ig: Immunglobulin, CH: Karbohydrate)

Die feste Bindung an Adhäsionsmoleküle setzt also eine Aktivierung der Integrine auf den Zelloberflächen der in der peripheren Blutbahn zirkulierenden Leukozyten voraus. Dieser Aktivierungsschritt wird wahrscheinlich durch sog. *Chemokine* induziert, kleine chemotaktische Zytokine, die so spezifisch das homing bestimmter Zellarten unterstützen (Tabelle 1.2.7). Für die Aktivierung von Eos spielen besonders die Vertreter der C-C Chemokine eine Rolle: RANTES, Eotaxin, MIP-1 α (migration inhibitory protein) und MCP-3 (major chemotactic protein) (97,102). Für Eotaxin konnte gezeigt werden, dass es in Meerschweinchen und Mäusen *in vivo* sowie bei menschlichen Zellkulturen *in vitro* die Anreicherung von Eos konzentrationsabhängig fördert (103, 104). Gemeinsam mit der Zytokin-abhängigen Expression von AM kann so die allergen-induzierte, gerichtete Infiltration von Eos in die betroffenen Atemwege bei Asthma bronchiale erklärt werden.

Tabelle 1.2.7: Chemokine für die Aktivierung von Leukozyten

Chemokin	Rezeptor	Zielzellen und Wirkung
IL-8	CXCR-1	Chemotaxis und Aktivierung von Neutrophilen
	CXCR-2	Chemotaxis von Basophilen und T-Zellen.
Eotaxin	CCR-3	Chemotaxis von Basophilen, Eosinophilen und T-Zellen.
MCP-3	CCR-1	Chemotaxis von Monozyten.
	CCR-2	Chemotaxis von Th2-Zellen.
	CCR-3	Chemotaxis von Eosinophilen.
MCP-4	CCR-2	Chemotaxis von Eosinophilen.
	CCR-3	Chemotaxis von Monozyten.
MIP-1α	CCR-1	Differenzierung und Chemotaxis von T-Zellen.
RANTES	CCR-1	Chemotaxis von Eosinophilen.
	CCR-3	Chemotaxis von Th2-Zellen.
	CCR-5	Chemotaxis von Monozyten, Basophilen.

In einer Reihe von tierexperimentellen Arbeiten in verschiedenen Spezies konnte gezeigt werden, dass durch Antikörper oder Fusions-Proteine die Bindung von AM verhindert werden kann. Durch die experimentelle Therapie mit Antikörpern gegen VLA-4 oder VCAM-1 konnte die eosinophile und lymphozytäre Infiltration der Atemwege nach Allergen-Provokation signifikant eingeschränkt und die Entwicklung von AHR verhindert werden (88, 105.108). Genetisch alterierte Mäuse, denen die Fähigkeit zur Expression von ICAM-1 fehlt, zeigen nach allergischer Sensibilisierung und Atemwegs-Provokation mit Allergen weder Zeichen einer eosinophilen Entzündung noch AHR (109).

1.2.3 T-Zellen in Asthma bronchiale

Lymphozyten sind rundliche, mononukleäre chromatin-reiche Leukozyten ohne Granula und mit geringem, bläulichem Plasmasaum. Sie entstehen aus omnipotenten hämopoietischen Stammzellen im Knochenmark und wandern für ihre weitere Differenzierung in die *primären lymphatischen Organe* aus. Dort entwickeln sie sich zu *B-Lymphozyten* (im Bursa-Äquivalent, Knochenmark) und *T-Lymphozyten* (im Thymus). Gereifte Lymphozyten werden dann kontinuierlich von diesen Organen freigesetzt, rezirkulieren und besiedeln für B- und T-Zellen unterschiedliche, fest definierte Regionen in den *sekundären lymphatischen Organen* (Milz und Lymphknoten). Hier treten sie in Kontakt mit nicht-eigenen Proteinen (Antigenen), die durch *Antigen-präsentierende Zellen* (APC) aufgenommen, zerlegt und auf deren Oberfläche präsentiert werden (110,112). Die spezifische Immunabwehr resultiert daraus je nach Lymphozyten-Subpopulation in der Produktion spezifischer *Antikörper* (humorale Abwehr: B-Zellen) und der Bereitstellung spezifischer *Helferzellen* zur Zytokin-Produktion und spezifischer *Effektorzellen* (zelluläre Abwehr: T-Zellen).

Bei der Entwicklung der T-Zellen werden im Thymus selbst-reaktive, also für körpereigene Strukturen spezifische T-Zellklone, selektiv eliminiert (*Tolereanzentwicklung*) (113,114). Frühe Thymozyten sind $CD4^+8^+$ und differenzieren sich danach in $CD4^+8^-$ (*Helferzellen*) und $CD4^+8^+$ T-Zellen (*Suppressorzellen*). Helferzellen erkennen Antigene in Verbindung mit Klasse II der *Haupthistokompatibilitäts-Antigene* (MHC) auf der Oberfläche der APC, bei Suppressorzellen wird Antigen in Verbindung mit MHC Klasse I-Antigen präsentiert. Nach der Antigenerkennung folgt eine Kaskade von intrazellulären Aktivierungsschritten (Signal-Transduktion), die letztlich zur Proliferation der spezifischen T-Zellen führt (*klonale Expansion*). Die stimulierten Zellen differenzieren dann in *Effektorzellen*, den Trägern der immunologischen Abwehr, und in *Memory-Zellen*, den Trägern des "immunologischen Gedächtnisses", und patrouillieren im Körper auf der Suche nach spezifischem Antigen. Als Zeichen der Aktivierung exprimieren T-Zellen spezifische Oberflächenmarker, nämlich CD69, CD25 (Rezeptor für IL-2), HLA-DR (MHC Klasse II) und VLA-1 (Integrin), und produzieren mRNA für die Transkription von verschiedenen Zytokinen (115,117).

Erst in den letzten 10 Jahren wurde die herausragende Rolle der T-Zellen in der *Pathogenese von Asthma bronchiale* erkannt. T-Zellen sind verantwortlich für die Induktion, die Regulierung und die Aufrechterhaltung der Immunreaktion und der begleitenden entzündlichen Reaktion im Verlauf der Entwicklung von Asthma. Die Anzahl der Gesamt-T-Zellen und die Höhe der Aktivierung dieser T-Zellen sind bei asthmatischen Patienten in Korrelation mit dem Grad der AHR deutlich erhöht (46, 118, 124). Bestimmte T-Zell-Zytokine (IL-4, IL-5), welche für die Regulierung der *IgE-Produktion* (siehe 1.2.3.1) und die Entwicklung der *eosinophilen allergischen Entzündung* (siehe 1.2.3.2) verantwortlich sind, finden sich vermehrt in bronchialen Biopsaten, der BAL-Flüssigkeit und im Serum von Asthmatikern (59, 119, 125, 128). Das Überwiegen der Produktion dieser sog. *Th2-Zytokine* wird letztlich für die Entstehung der Allergie/ Atopie bei entsprechend prädisponierten Patienten verantwortlich gemacht (siehe 1.2.3.3). Eine genaue Effektorfunktion der T-Zellen in der Entwicklung von AHR ist bislang aber immer noch fraglich.

1.2.3.1 IgE-Produktion und Bronchospasmus

Lange Zeit galt die Produktion von IgE (historisch: “Reagin”) nach Kontakt mit Umweltstoffen als Prototyp und Grundvoraussetzung für die Entstehung allergischer Erkrankungen (129,132). IgE bindet am hochaffinen Rezeptor an Mastzellen und Basophilen und leitet nach Allergen-Kontakt die Aktivierung und Degranulierung dieser Zellen ein (siehe 1.2.2.1). So kann die Entstehung der *allergischen Sofortreaktion* erklärt werden. Im Falle von Asthma bronchiale spricht man von der “*early asthmatic reaction*” (EAR), dem Bronchospasmus, der beim sensibilisierten Patienten etwa 10 min nach Allergen-Kontakt beginnt, nach einer halben Stunde das Maximum erreicht und nach wenigen Stunden verschwunden ist (133).

Die (genetische) Prädisposition bestimmter Patienten zur inapprobaten IgE-Produktion als Reaktion auf Kontakt mit äußerlichen Antigenen, wie z.B. Blütenpollen oder Insektengiften, wird als *Atopie* bezeichnet . Im Falle des Asthma bronchiale weisen insbesondere Kinder zumeist den atopischen Reaktionstyp auf, entsprechend wird dieser Erkrankungstyp als *allergisches oder extrinsisches Asthma*, im Gegensatz zu nicht-allergischem, *intrinsischem Asthma*, eingestuft. Die genaue Rolle von IgE in der Pathogenese von Asthma bronchiale ist nicht geklärt. Da nicht alle Atopiker auch Asthmatiker, andererseits nicht alle Asthmatiker auch Atopiker

sind, erscheint das Vorhandensein von IgE weder hinreichend noch als Voraussetzung für die Entstehung der Erkrankung. Zweifellos spielt aber die IgE-vermittelte Mastzell-Aktivierung als Auslöser der Bronchokonstriktion nach Allergen-Kontakt und als Verursacher einer kurzfristigen Exazerbation der Erkrankung eine wichtige Rolle (134.136).

Struktur von IgE: IgE weist ein Molekulargewicht von 190 kD und besteht, wie auch andere Ig, aus zwei identischen *schweren* und zwei identischen *leichten Ketten*, die durch Disulfid-Brücken verbunden sind (Abb. 1.2.4). Der *konstante* Abschnitt der schweren Ketten (C_H), der den *Isotyp* des Ig bestimmt, besteht beim IgE-Molekül aus der ϵ -Kette mit vier Domänen, $c_{\epsilon}1$ - $c_{\epsilon}4$. Die leichten Ketten sind für alle unterschiedlichen Isotypen identisch. Die *variablen* Abschnitte der schweren (V_H) und leichten Ketten (V_L) sind für jeden B-Zell-Klon individuell verschieden und determinieren gemeinsam den *Idiotyp*, d.h. die Spezifität, gegen die das Ig gerichtet ist. Enzymatische Verdauung an den Disulfid-Brücken zerlegt das Molekül in den Fc-Abschnitt, der am entsprechenden Ig-Rezeptor (Fc-Rezeptor) bindet, und den Fab-Abschnitt, der die Antigen-bindende Struktur beinhaltet (137).

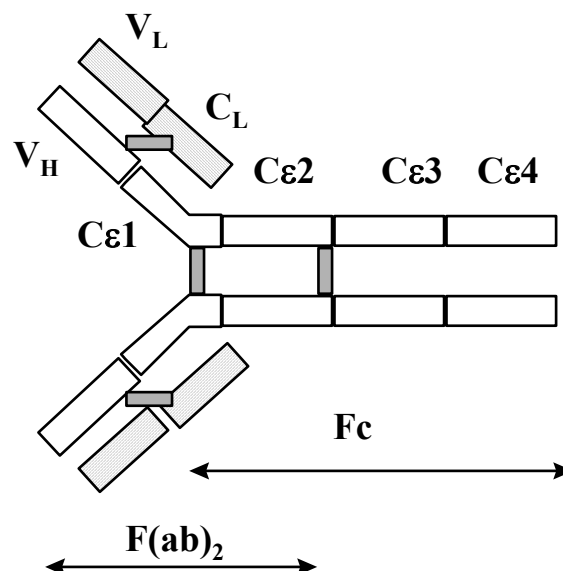


Abbildung 1.2.4: Struktur von IgE

VDJ-Rekombination: Im ersten Schritt zur Herstellung eines funktionsfähigen IgE-Moleküls kommt es bei der Ausbildung der genetischen Information zur Kodierung des variablen Abschnittes der schweren Kette (V_H), also zur Festsetzung des *Idiotyps* oder der individuellen *Antikörperdiversität*. Hierzu werden entfernt liegende Abschnitte der Keimbahn-DNA der Prä-B-Zelle durch “rearrangement” zusammengefügt. Es werden so aus einem von hunderten V-Genen, einem von ca. zehn D-Genen und einem von vier J-Genen eine funktionelle VDJ-Gen-Kombination in der B-Zelle geschaffen (Abb. 1.2.5). In ähnlicher Weise werden die DNA-Abschnitte für die Kodierung der variablen (V_L) und konstanten Abschnitte (C_L) der leichten Ketten durch ein Verbindungs-Gen (J-Region) zusammengefügt, so dass ein funktioneller DNA-Abschnitt zur Kodierung der leichten Ketten entsteht (VJ-Rekombination). Durch die Vielzahl der Kombinationsmöglichkeiten und die Möglichkeit der somatischen Mutation der einzelnen Genabschnitte ist hierdurch der Grundstein für die Diversität der Antikörper gelegt (138, 139).

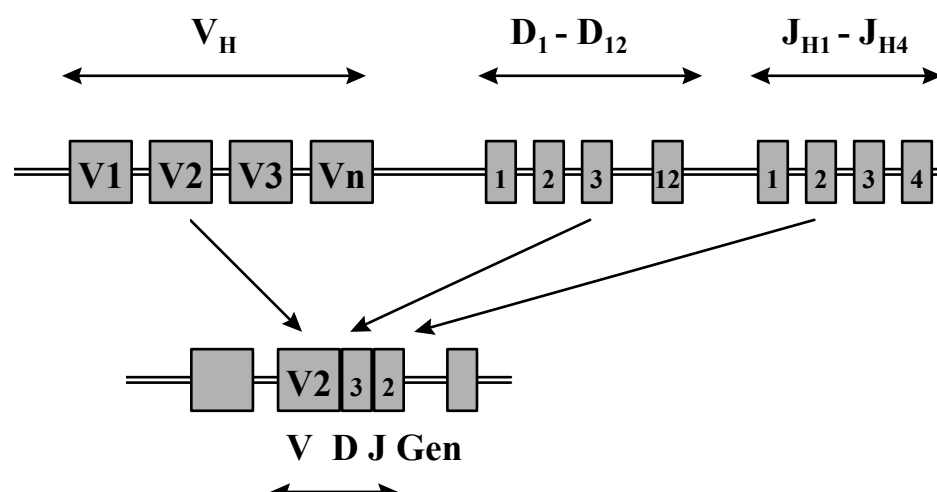


Abbildung 1.2.5: VDJ-Rekombination der schweren Kette

IgE-Isotypen-Wechsel: Die unterschiedlichen *Isotypen* eines Antikörpers benutzen alle die identischen Genabschnitte für die Kodierung der variablen Abschnitte (VDJ). Ein Isotypen-Wechsel (“switch”, z.B. von IgM zu IgE) erfordert also lediglich den Wechsel des konstanten Abschnitts der schweren Ketten (C_H). In der Keimbahn-DNA liegen die Abschnitte für die Kodierung der unterschiedlichen Isotypen für IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgE und IgA in dieser Reihenfolge nebeneinandergereiht auf

einem von der VDJ-Region entfernten Chromosomenabschnitt. Den einzelnen Domänen steht jeweils eine “switch-Sequenz” (*S-Region*) voran, eine *Rekombinations-Region*, die den Isotypen-Wechsel ermöglicht (Abb. 1.2.6). Beim Isotypen-Wechsel wird zunächst unter Fortfall der nicht benötigten Gene die S-Region des entsprechenden Isotyps neben die VDJ-Region gelagert. Danach wird die S-Region herausgeschnitten (*Spleißen*) und der DNA-Abschnitt in RNA umgeschrieben (*Transkription*). Damit liegt die funktionelle produktive mRNA für die Produktion der gesamten schweren Kette des IgE-Moleküls vor (140, 141).

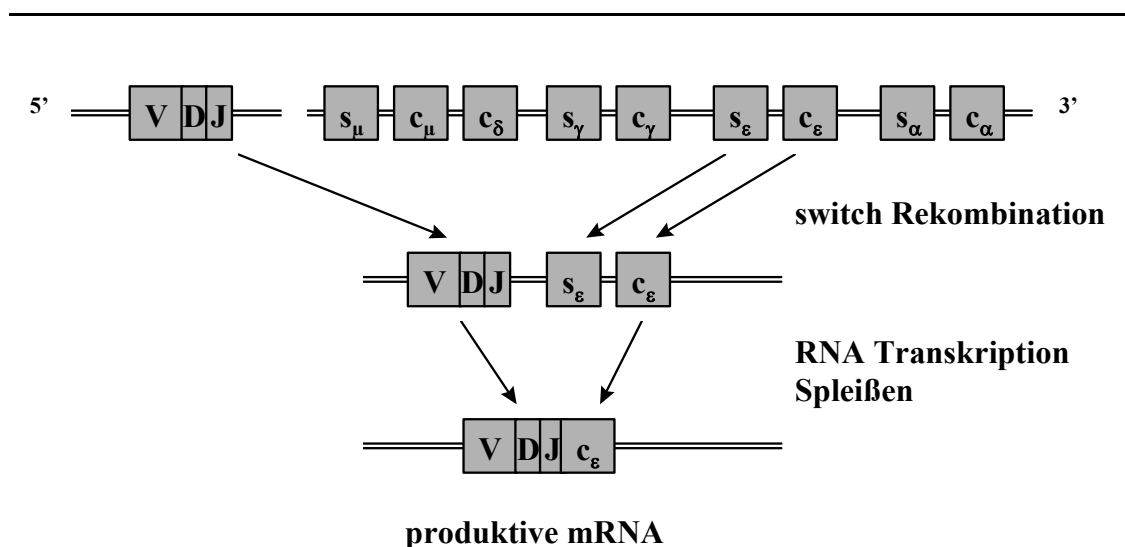


Abbildung 1.2.6: Isotypen-Wechsel (switch) zu IgE

Regulierung der IgE-Produktion: In der Regulierung der IgE-Produktion spielen T-Zellen durch die Produktion von Zytokinen und durch direkte T-B-Zell-Interaktion die entscheidende Rolle (Abb. 1.2.7). Für die Induktion der IgE-Synthese sind *zwei Signale* notwendig (142). Ein erstes Signal, IL-4 oder IL-13, induziert die unvollständige Keimbahn- ("germline") Transkription des C_{ϵ} -Gens. Das so entstandene Transkript (1.7-1.9 kB) stellt eine noch unreife Form der ϵ -mRNA ohne VDJ-Abschnitt dar und ist für die IgE-Synthese alleine nicht ausreichend. Ein zweites Signal (T-B-Zell-Interaktion) aktiviert die B-Zellen und induziert die Bildung einer

Rekombinase, die aus der germline die reife Form der ϵ -mRNA (2.0 kB) herstellt (switch-Rekombination, s.o.). Durch Translation dieser ϵ -mRNA wird die komplette schwere Kette für den Isotypen-Wechsel zu IgE gebildet.

Die Aktivierung ruhender B-Zellen (2. *Signal*) erfolgt durch direkte Interaktion mit aktivierten T-Helferzellen. Initial wurde die kognitive T-B-Zell-Interaktion durch T-Zell-Rezeptor (TCR)/ CD3-Komplex auf T-Helferzellen und Haupt-Histokompatibilitäts- (MHC) Klasse II Antigen auf B-Zellen als wesentlich angesehen. Mittlerweile wurde gefunden, dass auch die nicht-kognitive T-B-Zell-Interaktion die IL-4-induzierte Synthese von IgE unterstützt. Diese Interaktion wird vermittelt durch das B-Zell-Antigen CD40 und den entsprechenden T-Zell-Liganden (CD40L, gp39) (143, 144). CD40 ist ein Glykoprotein, das von B-Zellen, Dendritischen Zellen und Thymusepithelzellen exprimiert wird. *In vitro*-Kulturen von isolierten B-Zellen mit IL-4 und monoklonalen Antikörpern gegen CD40 induziert die Synthese hoher IgE-Spiegel (145, 146). Anti-CD40 Antikörper alleine induzieren die IgE-Synthese nur in solchen B-Zellen, die bereits *in vivo* zum IgE-Isotyp determiniert waren, also z.B. in B-Zellen von atopischen, nicht aber von normalen Patienten. IL-4 induziert die Expression von CD40 auf B-Zellen. Auf B-Zellen atopischer Patienten konnte die gesteigerte Expression von CD40 nachgewiesen werden, wahrscheinlich die Folge der *in vivo*-Exposition mit IL-4. Der natürliche Ligand von CD40 (CD40L) wird auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen exprimiert. Bei Patienten mit einer Punktmutation des CD40L-Gens werden die ausgeprägte Verminderung des Isotypen-Wechsels zu IgG oder IgE und eine erheblich eingeschränkte Antikörperproduktion beobachtet (Hyper-IgM-Syndrom) (147).

Neben T-Zellen sind andere Faktoren beschrieben worden, die ruhende B-Zellen aktivieren und in Verbindung mit IL-4 zur IgE-Synthese anregen können (*T-Zell-unabhängige IgE-Synthese*). Stimulation von menschlichen B-Zellen mit IL-4 und Epstein-Barr-Virus (EBV) als zweites Signal induziert die *de novo* IgE-Synthese (148). Gleiches gilt für Hydrocortison, eine Beobachtung, die den initialen IgE-Anstieg nach systemischer Kortison-Therapie bei Atopikern erklären kann (149).

Die IgE-Synthese wird entscheidend durch *Zytokine* moduliert, die von aktivierten T-Zellen und anderen Zellen produziert werden. Der *Hauptaktivator* der IgE-Synthese ist IL-4 (*1. Signal*) (142, 150.152). IL-4 vermag die IgE-Synthese *in vitro* wie auch *in vivo* anzuregen, ohne Zugabe von T-Zellen oder LPS fördert es jedoch nur die Bildung der Keimbahn-Transkription. Anti-IL-4-Behandlung von infizierten Mäusen verhindert die Produktion von IgE (153, 154), und in Mäusen, denen durch genetische Alteration die Fähigkeit zur IL-4-Produktion fehlt (IL-4 knock-out), führt eine parasitäre Infektion nicht wie sonst zur gesteigerten IgE-Produktion (155.157). Daneben sind andere Zytokine beschrieben worden die die IL-4-induzierte IgE-Produktion fördern: IL-5, ein nicht-isotypen-spezifischer B-Zell-Wachstumsfaktor, IL-6, ein nicht-isotypen-spezifischer B-Zell-Differenzierungsfaktor und TNF- α . Ein erst kürzlich beschriebenes Zytokin, IL-13, erhöht die IgE-Produktion in IL-4-unabhängiger Weise. IL-13 erhöht die IgE-Synthese in Kulturen peripherer, mononukleärer Zellen und induziert die Produktion von C ϵ -germline-mRNA in isolierten B-Zellen, ohne synergistisch oder antagonistisch auf IL-4 zu wirken (158, 159).

Als *Inhibitoren* von IL-4-induzierter IgE-Synthese sind IFN- γ , IFN- α , IL-8, IL-12, PGE₂ und andere charakterisiert worden (152). IFN- γ ist in dieser Hinsicht *in vivo* und *in vitro* am genauesten untersucht und stellt wahrscheinlich den wesentlichen, inhibitorischen Mediator der IgE-Synthese dar (160.162). Die Höhe der IgE-Produktion, induziert durch menschliche oder Maus-T-Zellen, hängt wesentlich von dem Verhältnis der von den T-Zellen produzierten Zytokine IL-4 und IFN- γ ab (siehe 1.2.3.3). Die IL-12-bedingte Verminderung der IgE-Synthese ist ein indirekter Effekt, ebenfalls vermittelt durch IFN- γ {1749}.

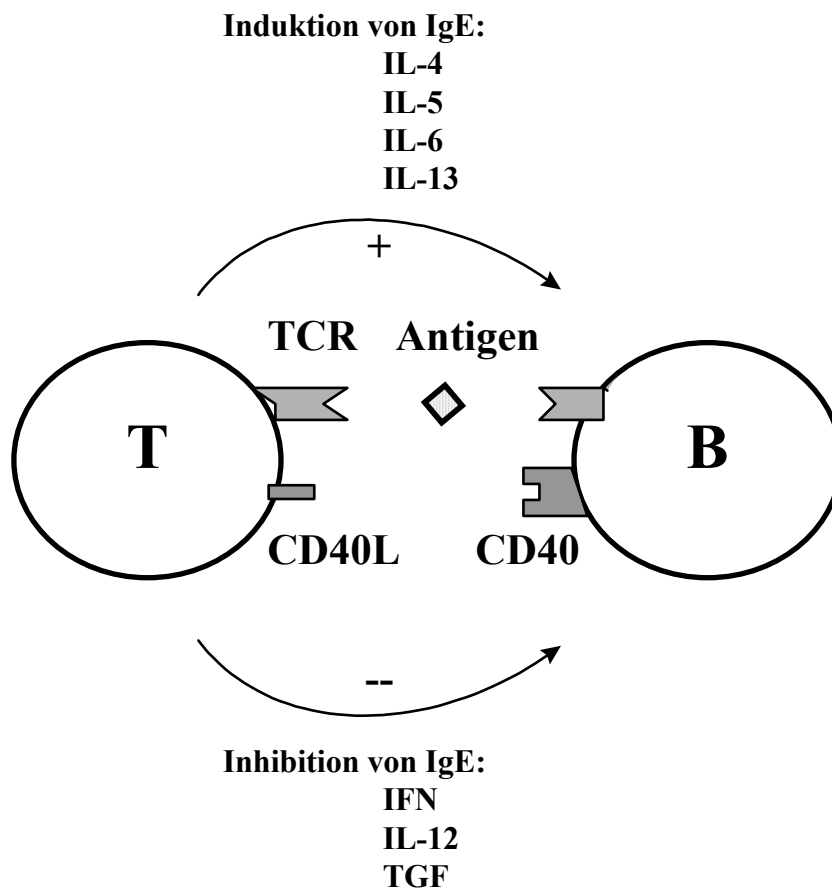


Abbildung 1.2.7: Regulation der IgE-Synthese

1.2.3.2 Eosinophile Entzündung und Spätreaktion

Die Induktion der allergischen eosinophilen Infiltration der Atemwege unter Vermittlung von und unter der Regulation durch T-Zellen gilt als essentiell für die Entwicklung von AHR bei Asthma bronchiale. Die Reifung und Differenzierung der Eos steht unter der Kontrolle von *T-Zell-Zytokinen*: IL-3, IL-5 und GM-CSF. Während IL-3 und GM-CSF auch die Hämpoese anderer Zelllinien, wie z.B. Neutrophiler, unterstützen, stellt IL-5 den einzigen spezifischen Wachstumsfaktor für Eos dar (163.167). IL-5 fördert nicht nur die Differenzierung und das Wachstum von KM-Vorläuferzellen der eosinophilen Reihe, sondern stellt auch einen potenten und spezifischen Aktivator der eosinophilen Funktion dar. IL-5 induziert Membranverschiebungen und die Granulierung von Eos, verbunden mit erhöhter Zytotoxizität, Phagozytoseaktivität und Radikalbildung (85, 168.171). Bei Patienten

mit Asthma bronchiale konnte eine erhöhte IL-5-Produktion durch T-Zellen in der BAL und aus bronchialen Biopsaten nachgewiesen werden. Weiterhin sind die IL-5 Serumspiegel bei Asthmatikern erhöht und korrelieren mit dem Schweregrad der Erkrankung (124, 172, 173).

Zusätzlich zu der oben beschriebenen EAR treten bei etwa der Hälfte aller Asthmatiker und bei etwa 75% aller asthmatischen Kinder eine Atemwegs-Obstruktion zu einem zweiten, späteren Zeitpunkt auf. Diese als "*late asthmatic reaction* (LAR) oder "*late-phase reaction*" (LPR) bezeichnete Reaktion tritt erst etwa 3-4 Stunden nach Exposition auf und hält bis zu 24 Stunden an (174, 175). Es konnte gezeigt werden, dass sich die LAR bevorzugt in den Abschnitten der Atemwege entwickelt, in denen ein allergischer (eosinophiler) Entzündungsprozeß stattfindet. Am Modell der atopischen Dermatitis konnten in Hautabschnitten nach LPR aktivierte T-Zellen und aktivierte Eos nachgewiesen sowie die Produktion von IL-3, IL-5 und GM-CSF durch T-Zellen nach Allergen-Provokation beschrieben werden (176,178). Ähnlich konnten in der BAL Flüssigkeit nach Allergen-Provokation und in Biopsaten von Asthmatikern aktivierte T-Zellen und T-Zell-Produkte, insbesondere IL-3 und IL-5, nachgewiesen werden (58, 128, 179, 180). Es ist daher wahrscheinlich, dass die T-Zell-vermittelte eosinophile Entzündung die Grundlage der Entstehung der LAR ist. Damit erinnert die Entstehung der LAR an die Entwicklung der AHR, die mit der chronischen Entzündung der Atemwege eng verbunden ist. Der Nachweis der erheblichen eosinophilen Infiltration der Atemwege bei Asthmatikern und das Wissen um die schädigende Wirkung der eosinophilen basischen Proteine (siehe 1.2.1.2 B) machen die Eos zu einer zentralen Zelle in der Pathogenese von Atemwegs-Entzündung und AHR bei Asthma bronchiale.

Abbildung 1.2.8 faßt die wesentlichen Elemente in der Pathogenese von Asthma bronchiale zusammen. Dargestellt sind die Th2-vermittelte IgE-Produktion, die Aktivierung von Eosinophilen und die Induktion der leukozytären Infiltration, die zur Ausbildung der chronischen Atemwegs-Entzündung und AHR führen. Die möglichen Querverbindungen zwischen beiden Prozessen sind fraglich und z.T. Gegenstand der hier vorgestellten Untersuchungen.

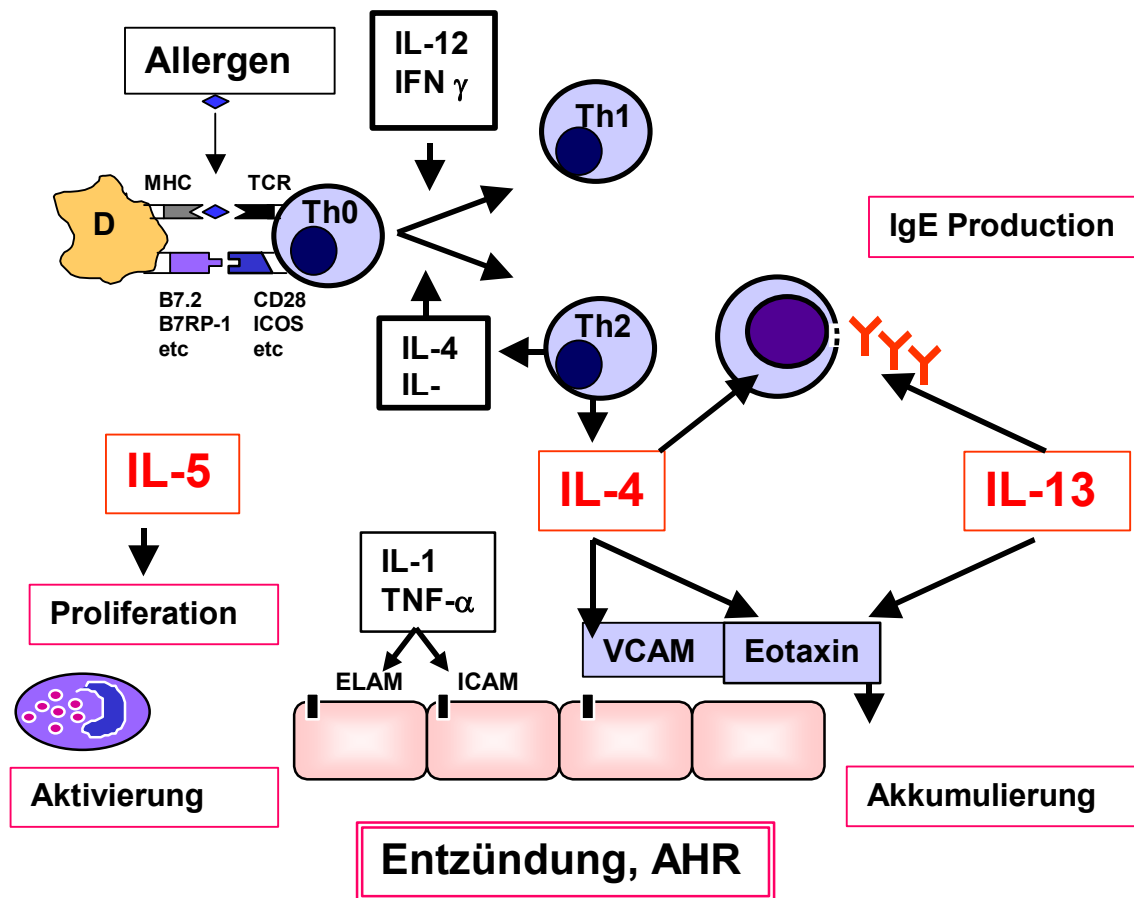


Abbildung 1.2.8: Synopsis über die Entstehung von Atemwegs-Obstruktion, Atemwegs-Entzündung und AHR

1.2.3.3 Konzept der Th1 und Th2 Zellen

Aufgrund unterschiedlicher Zytokin-Profile wurde die Einteilung von $CD4^+$ T-Helferzellen in zwei Subklassen (T_H1 vs. T_H2) zuerst von Mosmann und Coffman nach Untersuchungen in Maus-T-Zell Klonen vorgeschlagen (181.183). T_H1 -Zellen, nicht aber T_H2 -Zellen produzieren IL-2, IFN- γ und Lymphotoxin, wohingegen T_H2 -Zellen, nicht aber T_H1 -Zellen IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 produzieren (Tabelle 1.2.8).

Tabelle 1.2.8: Einteilung von T-Zellen nach ihrem Zytokin-Profil

Typ	Zytokin-Profil
Th1	IL-2, IL-3, IFN- γ , TNF- α/β , Lymphotoxin, GM-CSF
Th2	IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, GM-CSF

IL-3 und Granulozytärer-Monozytärer Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) werden von beiden T-Zellarten produziert. T_H1 -Zellen scheinen wesentlich an der Aktivierung von Makrophagen und der Produktion von IgG2a und IgG3 beteiligt zu sein, welche die Antikörper-abhängige zytotoxische Immunreaktion und Komplementaktivierung vermitteln. Dagegen unterstützen T_H2 -Zellen primär die Entwicklung und Aktivierung von Mastzellen und Eos und die Reifung und Differenzierung von B-Zellen mit der Produktion von IgE und IgG1. Im Hinblick auf die IgE-Synthese ist die selektive Expansion von T_H2 -Zellen wesentlich, da nur dieser T-Zell-Subtyp aufgrund der IL-4-und IL-13 Sekretion zum IgE-Isotypen-Wechsel führen kann. Darüber hinaus fördern die Zytokine des T_H2 -Typs die Differenzierung und Aktivierung von Mastzellen (IL-3, IL-4) und Eosinophilen (IL-3, IL-5), zwei Schlüsselzellen der allergischen Reaktion.

Der Mechanismus, der die *Differenzierung* von ruhenden T-Zellen in T_H1 - oder T_H2 -Zellen reguliert, ist nicht völlig geklärt. Genetische Faktoren, die Art des Antigens, der Ort des Antigen-Kontakts oder die Art der Antigen-präsentierenden Zelle scheinen hierfür wesentlich zu sein (184.186). Naïve T-Zellen ($Th0$) können sich unter dem Einfluß bestimmter Zytokine entweder zu Th1 oder Th2 Zellen entwickeln (187). *In vitro* wurde gezeigt, dass sich in Gegenwart von IFN- γ

präferentiell T_H1-Zellen differenzieren, wohingegen IL-4 die Bildung von T_H2-Zellen fördert. Bestimmte Organismen, wie Listerien und Toxoplasmen, die eine starke Th1-Immunantwort auslösen, beinhalten Antigene, die direkt die Freisetzung von IL-12 durch Makrophagen induzieren (188, 189). IL-12 wiederum unterstützt direkt die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th1-Zellen. Weniger klar ist die präferentielle Stimulierung einer Th2-Antwort nach Allergen-Kontakt bei atopischen Patienten. Da die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th2-Zellen unter der Kontrolle von IL-4 steht, wird die frühe Produktion von IL-4 durch andere als T-Zellen postuliert. Kandidaten hierfür sind Mastzellen und Basophile, für die IL-4 Produktion nach FcεRI-Aktivierung gezeigt werden konnte (190, 191).

In vitro gewonnene, allergen-spezifische T-Zellklone von atopischen Patienten gehören überwiegend dem T_H2-Typ an und unterstützen die IgE-Produktion und die Differenzierung von Eosinophilen *in vitro*. Dagegen sind aus den gleichen Patienten gewonnene T-Zellklone, die für andere, nicht-allergene Antigene spezifisch sind, oder T-Zellklone von nicht-atopischen Patienten, die für das gleiche Allergen spezifisch sind, überwiegend T_H1-Zellen (192, 193).

In vivo ist eine so deutliche Einteilung der T-Helferzellen in zwei Subtypen beim Menschen bislang schwierig (194, 195). Die meisten alloreaktiven, menschlichen T-Zellen von normalen Spendern haben intermediäre Zytokin-Profile. Bei atopischen Patienten ist die vermehrte Produktion von T_H2-Zytokinen (IL-4, IL-5) in Hautbiopsaten von Neurodermitikern und bronchialen Biopsaten von Asthmatikern nachgewiesen worden (s.o.). In Patienten mit atopischer Dermatitis wurden erhöhte IgE-Spiegel und vermehrte Expression von CD23 beschrieben, beides mögliche Folgen einer erhöhten *in vivo* IL-4-Produktion. Diese Daten lassen darauf schließen, dass das Ungleichgewicht zwischen IL-4- und IL-5- auf der einen und IFN-γ-Produktion auf der anderen Seite wesentlich für die Ausbildung der allergischen Reaktionen und die erhöhte IgE-Synthese bei Atopikern verantwortlich sein könnte. Untersuchungen über die Wirkung der Th2-Zytokine auf die Entstehung von Atemwegs-Entzündung und AHR und über Möglichkeiten der therapeutischen Intervention sind Hauptbestandteile der hier beschriebenen Untersuchungen.

1.3 Tiermodelle der Atemwegs-Hyperreaktivität

1.3.1 Tiermodelle für Asthma bronchiale

Tiermodelle sind für eine Vielzahl von Erkrankungen entwickelt worden, um die Pathogenese und Pathophysiologie bei der Entstehung dieser Krankheiten besser untersuchen zu können. Mit Hilfe dieser Modelle können Fragestellungen angegangen werden, die aus ethischen oder praktischen Gründen so nicht im Menschen untersucht werden können. Jedes Tiermodell leidet natürlich immer unter der eingeschränkten Übertragbarkeit der erhobenen Daten auf die klinische Situation im Patienten. Im Falle von Asthma bronchiale scheinen Tiere generell nicht unter der Erkrankung selbst zu leiden, wie das bei Patienten sehr wohl der Fall ist, so dass auch hier der Vergleich zwischen Tiermodell und klinischer Situation nur eine Annäherung darstellt (196). Dennoch erlauben Tiermodelle invasive Untersuchungen, die im Menschen so unmöglich sind, sowie die Verknüpfung von *in vitro* und *in vivo* erhobenen Daten. Die Entstehung von Atemwegs-Entzündung und AHR bei Asthma bronchiale ist zwar klinisch sehr gut beschrieben, bleibt im genauen Mechanismus jedoch unverstanden. Die bessere Definition der zugrundeliegenden Mechanismen ist aber Grundvoraussetzung, um bessere therapeutische und präventive Methoden in der Behandlung von Asthma bronchiale zu entwickeln, und genau hierzu können Tiermodelle einen wertvollen Beitrag leisten.

Als Modelle für Atemwegserkrankungen sind eine Vielzahl von Tierarten verwandt worden: Mäuse, Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen, Katzen, Hunde, Schafe, Pferde und Primaten. Jedes Tiermodell hat dabei Vorteile und Nachteile, die bei der Bearbeitung der spezifischen Fragestellungen abgewogen werden müssen. So bieten sich die größeren Tierarten besonders für Fragen zur Atemmechanik und respiratorischen Physiologie an (105, 197). Fragen zur Pathophysiologie und Intervention der Atemwegs-Entzündung können aber sehr viel kostensparender an kleineren (Nage-) Tieren untersucht werden (198, 202). Untersuchungen zu immunologischen Zusammenhängen bei der Entwicklung von Sensibilisierung und AHR wiederum setzen ein Modell voraus, in dem eine immunologisch sehr gut charakterisierte Tierart Verwendung findet. Hieraus ist ersichtlich, dass nicht ein

Tiermodell alle Fragen zu einer Erkrankung beantworten kann, sondern dass die Wahl des geeigneten Tiermodells für die Bearbeitung spezieller Aspekte der Erkrankung wesentlich den Erfolg und den Stellenwert der Untersuchungen bestimmt.

1.3.2 Validität von Tiermodellen

Ausgehend von der Definition und den klinischen Gegebenheiten von Asthma bronchiale sollte ein ideales Tiermodell die folgenden Charakteristika aufweisen: (1) Generalisierte Bronchokonstriktion nach Allergen-Exposition (EAR); (2) unspezifische *in vivo* AHR mit erhöhter Sensitivität (basale Lungenfunktion) und erhöhter Reaktivität (steilere Dosis-Wirkungs-Kurve); (3) unspezifische *in vitro* AHR von Lungen- oder trachealem Gewebe; (4) späte asthmatische Reaktion nach Allergen-Exposition (LAR); (5) Einfluß therapeutischer Interventionen mit gleicher Effektivität wie bei Patienten; und (6) asthmatische Atemwegs-Entzündung mit eosinophiler Inflammation. In allen Tiermodellen tritt, in der Ausprägung abhängig von der Tierart, AHR auf, die Gleichheiten und Verschiedenheiten zur AHR bei Patienten aufweist. Trotz dieser Einschränkung der Spezies-abhängigen Unterschiede können die generellen Mechanismen bei der Ausbildung von AHR zwischen Tiermodell und Mensch verglichen werden, um ihre Aussagekraft für die Situation im Patienten zu beurteilen.

Tiermodelle der AHR wurden ausgehend von den Beobachtungen etabliert, dass verschiedene Stimulanzien oder Agenzien bei normalen und/ oder asthmatischen Patienten zu erhöhter AR führen können (197). Man bedient sich also der unspezifisch stimulierten AHR, um (limitierte) mechanistische Aussagen zu Entstehung und Verlauf von Asthma bronchiale treffen zu können. Die unterschiedlichen Tiermodelle basieren daher auf sehr unterschiedlichen Modalitäten zur Erzeugung von AHR: Allergen-Sensibilisierung und –Inhalation (203), virale Infektion der oberen Luftwege (204, 205), Exposition mit Umweltschadstoffen wie Ozon und Stickoxide, Exposition mit Schadstoffen aus dem Arbeitsleben (Beschäftigungsasthma) wie Zyanaten oder Anhydriden. Allen diesen Modellen ist gemeinsam, dass durch die Exposition mit bestimmten Agenzien ein inflammatorischer Prozeß in den Atemwegen ausgelöst wird, der letztlich zu AHR führt. Hieraus ergibt sich, dass die unterschiedlichen Modalitäten (Tierart, Agens) zwar zu verschiedenen Formen der Entzündungsreaktionen führen können, aber

letztlich ein durch die Entzündungsreaktion ausgelöster Prozeß für die Entwicklung von AHR verantwortlich ist.

1.3.3 Bewertung von Tiermodellen

Ausgehend von den unter 1.3.1.1 geäußerten Einschränkungen und von den publizierten Ergebnissen aus veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten ergeben sich folgende Vor- und Nachteile für die Arbeit mit Tiermodellen für Asthma bronchiale. Die hauptsächlichen *Vorteile* liegen in den Möglichkeiten, (1) invasive reproduzierbare *in vivo*-Experimente durchzuführen; (2) technisch einfach und reproduzierbar Gewebe- und Zellproben für *in vitro*-Experimente zu gewinnen; (3) erhobene Daten in ähnlichen und gleichen Systemen zu validieren; (4) den Einfluß von genetischen und Umweltfaktoren auf die Entwicklung von AHR experimentell zu untersuchen; (5) neue therapeutische und präventive Ansätze für die Behandlung von Asthma vorklinisch für ihren Einsatz am Patienten zu testen.

Die wesentlichen *Nachteile* ergeben sich daraus, dass (1) der natürliche Krankheitsverlauf von menschlichem Asthma bronchiale nicht identisch in Tieren vorgefunden werden kann; (2) die Spezies-spezifischen Unterschiede der Atemwegs-Anatomie zu unterschiedlichen Ergebnissen bei den Bestimmungen von Histologie und Lungenfunktion führen, so dass die Bewertung in Abhängigkeit von dem gewählten Modell zu systematischen Fehlern führen kann; (3) jede Tierart einen variablen pathophysiologischen Mechanismus der Entstehung von AHR aufweisen kann; (4) Tierexperimente als unethisch angesehen werden können.

Nach Abwägung der Vorteile gegen die Nachteile ergibt sehr klar, dass auch weiterhin tierexperimentelle Studien unverzichtbar und wertvoll für Untersuchungen zu Physiologie und Pathophysiologie von Erkrankungen sind. Die Limitation der einzelnen Modelle sollte jedoch immer berücksichtigt werden, bevor Schlußfolgerungen aus den im Tiermodell erhobenen Daten für die klinische Situation gezogen werden können.

Um einen möglichst großen Nutzen aus tierexperimentellen Untersuchungen ziehen zu können, sollte das Modell sehr gut charakterisiert und verstanden werden. Das Modell kann nicht herangezogen werden, um ein Abbild für menschliches Asthma bronchiale zu erhalten, sondern durch die Charakterisierung eines einzelnen oder weniger Punkte, z.B. AI und AHR, sollten spezifische Hypothesen zum

Krankheitsverlauf und zur Intervention bei der Erkrankung überprüft werden. Hierdurch können wertvolle Erkenntnisse in den zugrundeliegenden Mechanismen bei der Entstehung von Atemwegs-Entzündung und AHR gewonnen und neue Ziele für die Behandlung von Asthma bronchiale definiert werden.

1.4 Ziele der Studie, Fragestellung

Asthma bronchiale ist durch Atemwegs-Hyperreaktivität und Atemwegs-Entzündung charakterisiert. In Folge der allergischen Sensibilisierung der Atemwege kommt es bei asthmatischen Patienten zur parallelen Ausbildung von drei Phänomenen (Abbildung 1.4.1): (1) zur Aktivierung von *Th2-T-Zellen* und Produktion von Th2-Zytokinen; (2) zur Bildung von allergen-spezifischem *IgE*; und (3) zur *eosinophilen* Infiltration der Atemwege.

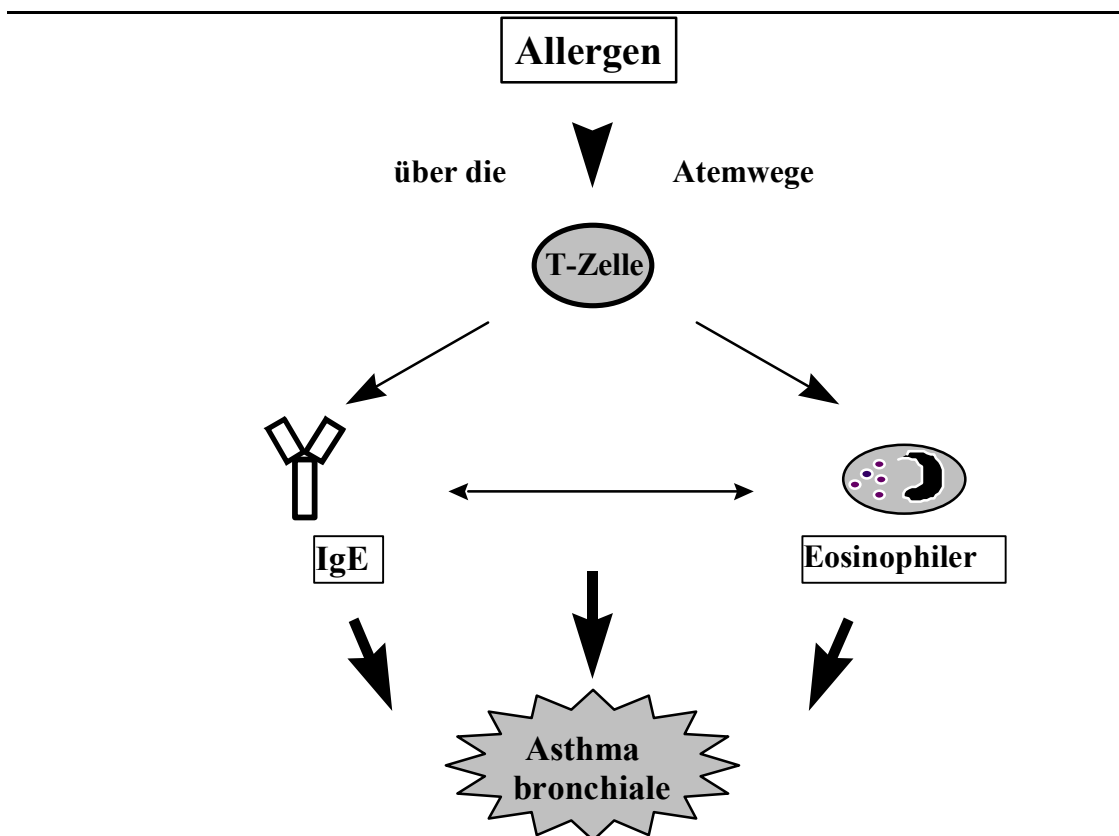


Abbildung 1.4.1: Hauptkomponenten bei der Entstehung von Asthma bronchiale

Th2-Zytokine spielen eine entscheidende regulative Rolle bei der Induktion der *IgE* Produktion (IL-4, IL-13) und für die terminale Differenzierung und das verlängerte Überleben von Eosinophilen (IL-5). *IgE* ist der Mediator der allergischen

Sofortreaktion und aktiviert die Degranulierung und Neusynthese pro-inflammatorischer Mediatoren durch Mastzellen. *Eosinophile* Granula setzen kationische Proteine frei, die direkt das bronchiale Epithel und die Pneumozyten beschädigen können. Für alle drei Komponenten konnte ein evidenter Zusammenhang mit der Ausbildung und dem Grad der Erkrankung bei asthmatischen Patienten nachgewiesen werden. Der genaue Mechanismus und die Interaktion der einzelnen Komponenten bei der Ausbildung der asthmatischen Entzündung und der Entwicklung von AHR bleiben jedoch unklar. Um diese besser definieren zu können, sind genauere Untersuchungen zum Pathomechanismus der Erkrankung notwendig. Hier bietet sich die Arbeit in einem Tiermodell für Asthma bronchiale und AHR an. Die Maus stellt aufgrund der gut definierten Immunologie sowie der Vielzahl an immunologischen Werkzeugen und genetisch alterierten Mausstämmen ein sehr geeignetes Modell zur Untersuchung dieser Fragestellungen dar.

Das *Ziel* der vorliegenden Arbeit ist es, die pathophysiologischen Grundlagen und Zusammenhänge und insbesondere die Bedeutung und Interaktion von T-Zell-Aktivierung, IgE-Produktion und eosinophiler Infiltration der Atemwege bei der Ausbildung von allergen-induzierter Atemwegs-Entzündung und AHR näher zu untersuchen.

Die *Hypothese* der Arbeit ist, dass in Abhängigkeit vom gewählten Modell einzelne Komponenten für die Entwicklung von AHR unterschiedliche Gewichtung einnehmen werden, dass aber die entzündliche Reaktion mit eosinophiler Infiltration der Atemwege einen gemeinsamen und wesentlichen Mechanismus bei der Ausbildung von AHR darstellt.

Folgende einzelne *Fragestellungen* werden bearbeitet:

- 1 Wie unterscheiden sich *unterschiedliche Modelle* der Sensibilisierung hinsichtlich IgE-Produktion, eosinophiler Entzündung und Entwicklung von AHR?
- 2 Welche Bedeutung haben *B-Zellen*, allergen-spezifische *IgE*-Produktion und IgE-vermittelte *Mastzell*-Aktivierung für die Entwicklung von Atemwegs-Entzündung und AHR in diesen Modellen?
- 3 Welche Bedeutung spielen *T-Zellen* und *T-Zell-Zytokine* für die Entwicklung von Atemwegs-Entzündung und AHR in diesen Modellen?
- 4 Welche Bedeutung haben *IL-5* und IL-5-vermittelte *eosinophile* Atemwegs-Infiltration für die Entwicklung von Atemwegs-Entzündung und AHR in diesen Modellen?
- 5 Welche möglichen *therapeutischen Ansätze* können daraus gefolgert werden?

2. Kapitel

Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Reagentien	Hersteller
Phosphate-buffered saline (PBS)	Gibco, Grand Island, NY
RPMI 1640 Medium	Gibco
Fetales Kälber Serum (FCS)	HyClone Lab., Logan, UT
Ovalbumin (OA, Grad V)	Sigma Chemicals, St. Louis, MN
ImjectAlum (Aluminium-hydroxid)	Pierce, Rockford, IL
Lymphocyte Separation Medium	Organon Teknika, Durham, NC
H3-Thymidin	ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA
2.1.2 Antikörper (AK)	Hersteller
Primäre, unkonjugierte AK für Immunglobulin- und Zytokin-ELISA	PharMingen, San Diego, CA
Sekundäre, FITC- PE- AP- oder Biotin- konjugierte AK für ELISA und FACS	PharMingen
Kaninchen-anti-Maus-MBP	Dr. G. Gleich, Mayo, Rochester, MN
Ratte-anti-Maus-IL-5 (TRFK-5)	Dr. R. Coffman, Palo Alto, CA
Ratte-anti-Maus-IgE (1-5)	Dr. C. Heuser, Basel, CH
2.1.3 Verbrauchsmaterial	Hersteller
Falcon Röhrchen 15 und 50 ml	Becton Dickinson,
Zelkultur-Flaschen 250/ 500 ml	Becton Dickinson
ELISA Platten Immulon II	Dynatech, Chantilly, VA
96-Loch Kulturplatten	Becton Dickinson
2.1.4 Geräte	Hersteller
Ultraschall-Nebulisator Aerosonic 5000	DeVilbis, Somerset, PA
Elektrischer Feld-Stimulator	Grass SIV5
Ganzkörper-Plethysmograph	Buxco, Troy, NY
Ventilator Modell 683	Harvard Apparatus, S. Natvick, MA
Resistenz-Programm	Labview, National Instruments, TX

Microplate Manager ELISA reader	Bio-Rads, Richmond, VA
Zell-Harvester	Cambridge Techn., Watertown, MA
Magnetische Zell-Isolierung	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, D
Epics Zytofluorograph	Coulter Electronics, Hialeah, FL

2.2 *In vivo* Tierversuche

2.2.1 Versuchstiere

2.2.1 Stamm	Herkunft
BALB/c	Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME
BALB/c nu/nu	Jackson Laboratories
B10.BR (B10)	Jackson Laboratories
C57BL6 (B6)	Jackson Laboratories
B-Zell-defiziente B10.BR	Dr. P. Marrack, Denver, CO
IL-4-defiziente C57BL6	Dr. L. Shultz, Ann Arbor, MN
IL-5-defiziente C57BL6	Dr. R. Lamers, MPI, Freiburg, D

Alle für die Versuche verwandten Tiere unterlagen den Vorschriften und Bestimmungen des Institutional Animal Care and Use Committee of the National Jewish Research Center, Denver. Alle Mäuse wurden in speziellen Käfigen bei OA-freier Diät im Tierhaus des National Jewish Research Center gehalten. Alle Tiere wurden als frei von Infektionen getestet. Für die Versuche wurden nur 8 bis 12 Wochen alte weibliche Tiere mit ähnlichem Gewicht (20-25 g) verwandt. Die unterschiedlichen Gruppen der einzelnen Versuche wurden immer parallel untersucht, meist 3 bis 4 Tiere pro Versuchsgruppe in einem Experiment von 12 bis 16 Tieren.

2.2.2 Betäubung

Bei einigen Versuchen war die Betäubung der Versuchstiere notwendig. Für intranasale Applikation von Antikörpern oder Allergen reichte die leichte Anästhesie mit Avertin (2.5%, 300 µl ip) aus. Bei Lungenfunktionsmessung an ventilierten Mäusen wurde eine weitreichendere Anästhesie mit Pentobarbital (50 mg/ kg KG, ip) durchgeführt.

2.2.3 Sensibilisierung mit Allergen

Für die Sensibilisierung mit Allergen wurden drei verschiedene Modelle untersucht, die sich grundsätzlich in der Art der Allergen-Zufuhr und in ihren Auswirkungen auf allergen-spezifische Ig Produktion und histologische Veränderungen der Zielorgane unterscheiden.

2.2.3.1 Atemwegs-Sensibilisierung

Hintergrund:

In dem ersten Modell der Atemwegs-Sensibilisierung werden die Mäuse ausschließlich über die Atemwege mit Allergen in Kontakt gebracht. Auch wird auf den Einsatz von Adjuvantien, d.s. unspezifische, immunstimulierende Wirkstoffe, die zusammen mit Antigen verabreicht werden, verzichtet. Hierdurch wird eine der Sensibilisierung von Patienten mit Hausstaub-Milben- oder Pollenallergen ähnliche Form der Sensibilisierung erreicht.

Durchführung:

Mäuse wurden in eine Plastikbox (≤ 8 gleichzeitig) gesetzt, die auf der einen Seite an einen Nebulisator und auf der anderen an einen Abzug angeschlossen war. Über den Nebulisator wurde aus einer Lösung von 1% OA in PBS ein Aerosol mit Einzelpartikeln in der Größe von $3.9 \pm 1.3 \mu\text{m}$ (gemessen durch einen Laser-Teilchen-Analysator) für 20 min täglich vernebelt. Die Sensibilisierung war nach 10 konsekutiven Tagen abgeschlossen (Tag 1-10 des Protokolls). Kontrollen wurden nach gleichem Protokoll mit PBS schein-sensibilisiert.

2.2.3.2 Passive Sensibilisierung

Hintergrund:

Im Normalfall führt die Applikation eines antigen wirkenden Stoffes im Wirt zur Bildung von Antikörpern (aktive Sensibilisierung/ Immunisierung). Antigen-spezifische Antikörper lassen sich jedoch auch durch Transfer aus Serum von vor-sensibilisierten Tieren oder aus Kulturüberständen Antikörperproduzierender Zellen in nicht-sensibilisierte Empfänger übertragen (passive Sensibilisierung).

Herstellung der Antikörper:

Zunächst wurden OA-spezifische Antikörperproduzierende B-Zell-Linien hergestellt: BALB/c Mäuse wurden ip zweimalig mit OA sensibilisiert, 14 Tage nach letzter Sensibilisierung wurden die Milz-MNC isoliert und in Kultur gebracht. Hybridome wurden durch Fusion der B-Zellen mit Maus-Myelomzellen SP 2/0 (ATCC, Rockville, MD) hergestellt. OA-Spezifität und Klonalität wurden durch wiederholtes Waschen der Zellen und anschließende Anreicherung des Mediums mit OA und durch die Technik des "limiting dilution" sichergestellt. Isotypen der OA-spezifischen Antikörper der einzelnen Linien wurde mittels ELISA bestimmt. Diese wurden nun in großem Umfang in Kultur gehalten, und der Zellüberstand in regelmäßigen Abständen geerntet. Die Ig wurden durch Protein-G-Säulen gereinigt und portioniert bei -70°C aufbewahrt.

Durchführung der Sensibilisierung:

Mäuse wurden passiv mit OA-spezifischen Antikörpern (0.4 µg in 200 µl PBS) der verschiedenen Ig-Klassen (IgE, IgG1, IgG2a) durch iv Injektion in die Schwanzvene an drei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 1-3 des Protokolls) sensibilisiert. Kontrollen erhielten anti-TNP-spezifische Antikörper (ATCC) nach dem gleichen Protokoll.

2.2.3.3 Systemische Sensibilisierung

Hintergrund:

Dieses Modell erlaubt, die Phasen der Sensibilisierung von der Phase der Atemwegs-Provokation mit Allergen abzugrenzen. Zudem stellt sie durch die Zufuhr von Adjuvans eine sehr viel stärkere Form der Sensibilisierung dar. Als Adjuvans wurde Aluminium-hydroxid ($\text{Al}(\text{OH})_3$) gewählt, welches wahrscheinlich durch die Verlängerung der Eliminierung und durch unspezifische Stimulierung des mononukleären Phagozyten-Systems (MPS) zu einer Verstärkung der Immunogenität des Antigens/ Allergens führt.

Durchführung:

Mäuse wurden durch ip Injektion von 100 µl einer Emulsion aus Allergen (20 µg OA) in Adjuvans (2 mg Al-OH) an den Tagen 1 und 14 des Protokolls sensibilisiert.

2.2.4 Provokation mit Allergen

Hintergrund:

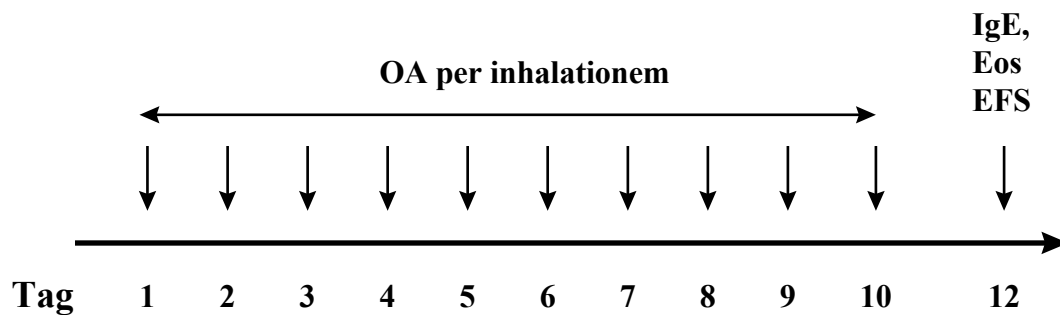
Bei den Sensibilisierungs-Protokollen 2 und 3 fehlt der direkte Kontakt der Atemwege mit dem Allergen. Eine Zuführung als Aerosol über die Atemwege garantiert, dass zumindest ein Teil die tiefen Atemwegs erreicht.

Durchführung:

Wie bei der Methode der Atemwegs-Sensibilisierung beschrieben wurden die Mäuse an den Tagen 6, 7 und 8 (passive) bzw. den Tagen 28, 29 und 30 (systemische Sensibilisierung) für jeweils 20 min mit 1% OA-Lösung in PBS provoziert. Kontrollen waren nicht-sensibilisierte Mäuse und sensibilisierte Mäuse mit Scheinprovokation durch PBS.

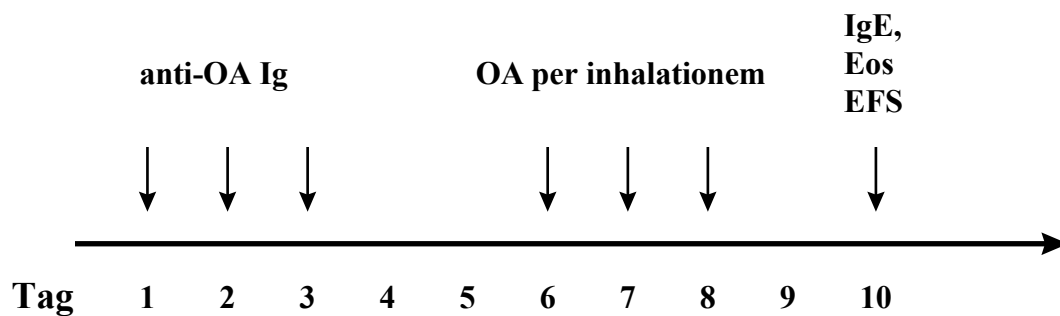
1. Atemwegs-Sensibilisierung

10 Tage OA per inhalationem als Aerosol; Tag 12 Messung der AR:



2. Passive Sensibilisierung

Tag 1-3 passive Sensibilisierung; Tag 7-9 OA-Provokation, Tag 11 Messung von AR:



3. Systemische Sensibilisierung

Tag 1 und 14 OA ip; Tag 28-30 OA-Provokation; 2 Tage später Messung der AR:

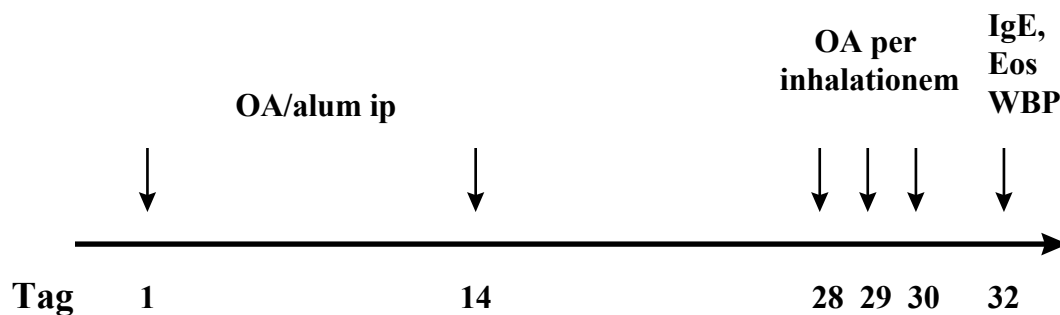


Abbildung 2.2.1: Übersicht über Sensibilisierungs- und Provokationsprotokolle

2.2.5 *In vivo* Zell-Depletion

Um den Einfluß bestimmter Zellarten auf Sensibilisierung und die Entwicklung von Atemwegs-Entzündung und AHR zu untersuchen, wurden *in vivo* CD8⁺ T-Zellen depletiert. Hierzu wurden 3-4 Wochen alte BALB/c Mäuse zunächst thymektomiert und dann 2 Wochen später ip mit 200µl Überstand von Aszites aus der Kultur von YTS 169 Zellen (Ratte-anti-Maus CD8, ATCC) behandelt. Die Spezifität des Antikörpers und optimale Verdünnung des Aszites wurden *in vivo* und *in vitro* gemessen und titriert. Die Antikörperbehandlungen wurden insgesamt 3 mal im Abstand von 3 Tagen durchgeführt. Kontrolltiere erhielten Kontroll-IgG (Ratten-IgG, Sigma).

2.2.6 *In vivo* Zell-Transfer

Nach positiver Selektion (siehe 2.3.6) der Zielzellen aus Milzzellen unbehandelter BALB/c Mäuse wurden 1×10^7 CD8⁺ T-Zellen (> 95% CD8⁺) pro Empfängertier iv am Tag 8 des 10-Tage-Sensibilisierungs-Protokolls (siehe 2.2.3.1) übertragen. Kontrollen erhielten die gleiche Anzahl CD8-negativer T-Zellen (< 1% CD8⁺) zum gleichen Zeitpunkt.

2.2.7 Antikörperbehandlung

Antikörper werden auf die gewünschte Konzentration verdünnt und zu verschiedenen Zeitpunkten (vor oder nach Sensibilisierung oder unmittelbar vor Provokation) in die laterale Schwanzvene intravenös appliziert (1-100 µg/Maus in 100 µl PBS).

2.2.8 Bestimmung der kutanen Hyperreaktivität (ICH)

Hintergrund:

Die ICH auf Allergen stellt eine klassische, durch IgE-vermittelte Mastzell-Aktivierung mit Freisetzung von Histamin ausgelöste Reaktion nach Sensibilisierung dar. Sie kann daher als gute *in vivo* Technik für die Feststellung und Quantifizierung der allergen-spezifischen Sensibilisierung und IgE-Produktion gewertet werden. Als

Besonderheit weisen Mastzellen der Maus neben dem hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI) auch Rezeptoren für IgG1 auf.

Durchführung:

Die Bauchhaut der Mäuse wird glattrasiert und die Testlösungen (30 µl) mit Allergen (OVA 500 µg in 1 ml PBS) oder PBS als Negativkontrolle streng intradermal appliziert. Nach 15 bis 20 min wird die Entwicklung der Hautreaktion durch eine über den Status der Versuchstiere nicht informierte Person abgelesen. Die Quaddelgröße wird gemessen und die Hautreaktion wird als positiv gewertet, wenn die Ausdehnung der Quaddel ≥ 3 mm in beliebiger Richtung beträgt.

2.2.9 Bestimmung der Atemwegs-Reaktivität

AHR ist einer der drei kardinalen pathognomonischen Eigenschaften, die bei Patienten mit BA gefunden werden. Eine direkte Bestimmung der Kontraktilität der glatten Muskulatur der tiefen Atemwege *in vivo* ist nicht möglich. Veränderungen des Muskeltonus können daher nur durch Bestimmungen der Kontraktilität der glatten Muskulatur *in vitro* (Methode 1, 2.2.6.1) oder mit Lungenfunktionsmessung erfaßt werden, die Veränderungen des Kalibers der Atemwege (Resistenzmessung, 2.2.6.2) oder Veränderungen der Atemlage (Plethysmographie, 2.2.6.3) aufzeigen. In Abhängigkeit von dem gewählten Modell der Sensibilisierung wurden drei verschiedene Methoden zur Bestimmung der Atemwegs-Reaktivität (AR) durchgeführt, wobei Veränderungen der AR nach Atemwegs- oder passiver Sensibilisierung nur mit der ersten Methode, 2.2.6.1, erfaßt werden konnten.

2.2.9.1 Bestimmung der trachealen Kontraktilität *in vitro*

Hintergrund:

Als Ursache der AHR gilt eine Erhöhung der Kontraktilität der glatten Muskulatur der Atemwege auf unspezifische Stimuli aufgrund neuronaler, funktionaler oder struktureller Veränderungen an der motorischen Endplatte als Folge z.B. von allergischer Atemwegs-Sensibilisierung. Im Maus-Modell kann die Kontraktilität der glatten Muskulatur der tiefen Atemwege nicht direkt gemessen werden, so dass die tracheale Kontraktilität nach Stimulation mit elektrischer Spannung als unspezifischer Stimulus als Maß für die Veränderungen an der glatten Atemwegs-Muskulatur

herangezogen wird. Unberücksichtigt bleiben hierbei Veränderungen der tiefen Atemwege und Einflüsse der Umgebung der Muskulatur, z.B. durch zelluläre Infiltration.

Durchführung:

Die Bestimmung der Kontraktilität erfolgte grundsätzlich 2 Tage nach Abschluß der Atemwegs-Sensibilisierung (Tag 12 des Protokolls) bzw. 2 Tage nach letzter Provokation von passiv sensibilisierten Mäusen (Tag 11 des Protokolls). Die Mäuse wurden getötet, die Trachea frei präpariert und ca. 0.5 cm lange Segmente isoliert. Diese wurden in Krebs-Henseleit-Medium an beiden Enden an dreieckigen Metallträgern fixiert, die die Kraft der Kontraktion aufnehmen und weiterleiten konnten. Elektrische Feldstimulation (EFS) wurde mit zunehmender Frequenz im Bereich von 0.5 bis 40 Hz auf das Gewebe ausgeübt, und die Kontraktionen mit Hilfe eines Schreibers als lineares Diagramm aufgezeichnet. Aus diesen wurden die Frequenzen ermittelt, die zu 50% der maximal erreichten Kontraktion geführt hatten (ES₅₀) und für die einzelnen Versuchsgruppen verglichen.

2.2.9.2 Bestimmung der Resistenz *in vivo*

Hintergrund:

Die *viskösen Widerstände*, die bei Inspiration und Expiration zu überwinden sind, setzen sich aus *Strömungswiderständen* (*Atemwegswiderstand*) und *nicht-elastischen Gewebswiderständen* (Widerständen des Lungengewebes aufgrund von Reibung und Gewebedeformation) zusammen. Ca. 90% des viskösen Widerstandes wird durch den Strömungswiderstand hervorgerufen, der daher dem gesamten viskösen Widerstand bei der Bestimmung gleichgesetzt wird.

Der *Atemwegswiderstand* oder Strömungswiderstand (R) entspricht dabei der Druckdifferenz zwischen dem *intraalveolären Druck* (P_{alv}) und dem *atmosphärischen Druck* an der Mundöffnung (P_{ao}), verkürzt als *intrapulmonaler Druck* (P_{pul}) bezeichnet,, geteilt durch die *Stromstärke* (V), die durch die bestehende Druckdifferenz (P_{pul}) hervorgerufen wird:

$$\begin{aligned} P_{\text{pul}} &= P_{\text{alv}} - P_{\text{ao}} \quad (\text{cm H}_2\text{O}) \\ R &= P_{\text{pul}} / V \quad (\text{cm H}_2\text{O} / \text{ml} / \text{sec}) \end{aligned}$$

Bei laminaren Strömungen ist R nach dem *Hagen-Poiseuilleschen* Gesetz vom Querschnitt (r) und der Länge (L) des Rohres sowie der Viskosität (μ) abhängig:

$$R = 8\mu L / \pi r^4$$

Daraus geht hervor, dass die wesentliche Determinante für R der Radius (r) des Rohres bzw. der Atemwege darstellt.

Die Bestimmung von R erfordert also die fortlaufende Messung des intrapulmonalen Druckes. Bei *Patienten* erfolgt dies durch einen Ganzkörper-Plethysmographen, bei dem indirekt Änderungen von P_{pul} durch Messung der proportional auftretenden Druckänderung in der abgeschlossenen Kammer erfaßt werden. Gleichzeitig wird die Atemstromstärke V über einen Pneumotachographen registriert. Bei *Versuchstieren* gibt es eine Vielzahl von Methoden. Die hier durchgeführten Experimente folgen im wesentlichen der Erstbeschreibung der invasiven Bestimmung der Resistenz in der Maus (206). Diese beruht auf den alten Arbeiten von Neergaard und Wirtz. Hierbei wird der pulmonale Druck direkt durch einen Druckumwandler an einem Tracheostoma als Differenz von Pleura- und Munddruck, von dem eine elastische Komponente abgezogen wird, gemessen, und die Resistenz als der Quotient zu der gemessenen Stromstärke bestimmt. Diese Methode ist invasiv und erfordert daher die Betäubung und kontrollierte Beatmung der Tiere. Von Vorteil ist, dass durch die tracheale Kanülierung der gesamte obere Respirationstrakt umgangen und daher als Störgröße ausgeschaltet wird.

Durchführung:

Die Bestimmung von R_L erfolgte in der Regel 2 Tage nach letzter Atemwegs-Provokation der systemisch sensibilisierten Mäuse mit Allergen (Tag 32 des Protokolls). Mäuse wurden mit Pentobarbital anästhesiert und tracheostomiert. An das Tracheostoma wird ein 4-Wege-Hahn angeschlossen, mit dem die beiden Anschlüsse des Ventilators für In- und Expiration verbunden werden. Die Ventilation wird eingestellt auf 160 Atemzüge pro min mit einem Atemzugvolumen (AZV) von 150 μ l und end-expiratorischem Druck von 2-4 cm H_2O während der Messungen, und auf 60 Atemzüge pro min mit einem AZV von 500 μ l während der Stimulation mit Metacholin (MCh). Der transpulmonale Druck, P_{pul} , wird durch einen Differenzmanometer registriert, der auf der einen Seite mit dem vierten Hahn des 4-Wege-Hahns und auf der anderen Seite mit einem Ausgang im Plethysmographen

verbunden ist. Änderungen der Lungenvolumina werden durch Bestimmung von Druckänderungen im Plethysmographen über einen zweiten Differenzmanometer, verbunden mit einer Referenz-Kammer, registriert. Die Stromstärke V wird durch digitale Differenzierung des Volumensignals berechnet. Die Bestimmung von R_L wird kontinuierlich durch Verrechnung von Stromstärke, Lungenvolumen und transpulmonalem Druck über ein Computerprogramm durchgeführt.

Als Modifikation zur ursprünglichen Beschreibung der Methode wurde das MCh nicht in die Jugular-Vene injiziert, sondern in Anlehnung an die Situation beim Patienten als Aerosol über den Ultraschall-Vernebler per inhalationem zugeführt. Hierzu wurde MCh für 10 sec je Dosierungsstufe mit ansteigenden Dosierungen bis zum Erreichen eines Plateau-Wertes von R_L vernebelt, und im Anschluß nach jeder Stufe wurde von 20 sec bis 3 min kontinuierlich R_L bestimmt. Die maximal erzielten Werte für R_L wurden verwandt, um die AR der verschiedenen Versuchsgruppen mit einander zu vergleichen.

2.2.9.3 Barometrische Plethysmographie *in vivo*

Diese Methode wird ausführlich im Kapitel 3.3.1 “Das Modell der systemischen Sensibilisierung” beschrieben (207).

2.3 *In vitro* Versuche

2.3.1 Bestimmung der Immunglobuline mittels ELISA

Venöses Blut wurde aus der Schwanzvene gewonnen und bei Raumtemperatur geronnen gelassen. Nach Zentrifugieren (5 min, 5000 rpm) wurden die Serumproben portionsweise bei -20°C eingefroren.

ELISA-Platten wurden frisch mit OA (20 µg/ ml) (für allergen-spezifische Antikörper) oder mit polyklonalem anti-Maus-IgE oder anti-Maus-IgG (3 µg/ ml in NaHCO₃-Puffer-Lösung, pH 9.6) (für Gesamt-Ig) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Tween 20-Lösung (0.02%) in PBS wurden die Platten mit 0.2% Gelatine-Puffer-Lösung, pH 8.2, für 2 h bei 37°C geblockt. Serum wurde 1:10 in Gelatine-Lösung verdünnt, in Duplikaten auf die

Platten gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden Alkalin-Phosphatase-konjugierte Ratte-anti-Maus-IgE, -IgG, -IgG1 oder IgG2a Antikörper zugefügt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Entwicklung der Farbreaktion durch Zugabe von Phosphatase-Substrat (Sigma 104) wurden die Platten in einem automatischen Leser bei 410 nm ausgewertet (BioRad Laboratories). Die Antikörper-Titer der Serumproben wurden gegen Standards verglichen. Standards von anti-OA IgE oder IgG1 wurden durch systemische Sensibilisierung von Mäusen mit OA in Alum hergestellt, titriert und portionsweise bei -70°C aufbewahrt. Die Höhe der Standards wurde als 100 ELISA Einheiten pro ml (100 EU/ml) definiert. Für die Standardisierung von Gesamt-IgE und IgG-Titer wurden kommerzielle Antikörper verwandt. Das Limit der Messbarkeit betrug 1 EU/ ml für spezifische Antikörper, 100 pg/ ml für IgE, 1 ng/ ml für IgG.

2.3.2 Präparation von Zellen

Milzen und peribronchiale Lymphknoten (PBLN) wurden präpariert, MNC durch Zerreiben von kleingeschnittenen Gewebestücken durch ein Stahlsieb und anschließende Dichtegradienten-Zentrifugation (5 min, 1500 rpm, 20°C) auf Lymphozyten-Trennmedium gereinigt. Die Zellen wurden dreimalig mit PBS gewaschen und in RPMI Medium mit Zusatz von 10% Hitze-deaktiviertem FCS, 5 mM L-Glutamin, 0.05 mM 2-Mercapto-Ethanol, 15 mM Hepes-Puffer, 100 U/ ml Penicillin und 100 µg/ ml Streptomycin (alles von Gibco) resuspendiert. Die Zellen wurden bei 37°C in einer angefeuchteten Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert.

2.3.3 Zell-Proliferation

Um die proliferative Reaktivität von Zellen sensibilisierter Tiere zu untersuchen, wurden MNC mit und ohne Zusatz von spezifischem Antigen kultiviert. 2×10^5 MNC wurden in Triplikaten in 96-Loch-Rundboden-Platten für 3 Tage inkubiert. In den letzten 6 h der Kultur wurden die Zellen durch Zugabe von 1 µCi (³H) Thymidin gepulst und durch einen Zell-harvester geerntet. Die Inkorporation von (³H) Thymidin wurde in einem Szintillations-Messgerät bestimmt.

2.3.4 CD8⁺ T-Zell-Isolierung

CD8⁺ T-Zellen wurden positiv aus Milz-MNC von unbehandelten Mäusen selektioniert. Hierzu wurden die Zellen mit anti-CD8-konjugierten magnetischen beads inkubiert und magnetisch aussortiert. Die selektionierte Fraktion bestand in der FACS-Analyse zu > 95% aus CD8⁺ T-Lymphozyten, die depletierte Fraktion enthielt weniger als 1% CD8⁺ Zellen.

2.3.5 T-Zell-Anreicherung, T-Zell-Depletion *in vitro*

B- und T-Zellen zeigen eine unterschiedliche Affinität zu verschiedenen Trägermedien: Die Passage von MNC über Nylonwolle bedingt durch die höhere Affinität von B-Zellen und Makrophagen eine selektive Anreicherung von T-Zellen. MNC (10⁸/ ml) wurden in RPMI-Medium in einer mit Nylonwolle (ca. 1 g, 2 ml) gefüllten 12 ml Spritze bei 37°C für 60 min inkubiert. Die non-adherente Zellsuspension wurde mit Medium ausgewaschen, und die ersten 15 ml dieser Suspension zentrifugiert (5 min, 1500 rpm, 4°C), in Medium resuspendiert und als angereicherte T-Zellen verwandt. In der FACS-Analyse wurde eine Reinheit von > 85% CD3+ T-Lymphozyten nachgewiesen.

Für die Gewinnung von APC wurden T-Zellen aus MNC durch Inkubation in anti-Thymozyten-Serum und anschließendes Hinzufügen von Kaninchen-Komplement depletiert, und die T-Zell-freien MNC bei 3000 rad bestrahlt.

2.3.6 Durchfluß-Zytometrie

Milz- und PBLN MNC wurden in Färbe-Pufferlösung (PBS, 2% FCS, 0.2% Natrium-Azid) mit entsprechenden Antikörpern (FITC- oder Biotin-konjugierte anti-Maus-mAb, PharMingen) für 2 h bei 4°C inkubiert. Bei Verwendung von Biotin-konjugierten AK wurde die Farbreaktion in einem zweiten Schritt mit Inkubation mit PE-konjugiertem Streptavidin vervollständigt. Die angefärbten Zellen wurden in einem Zytofluorographen analysiert, die Fluoreszenz-Intensität wurde mit negativen Kontrollen verglichen, die lediglich mit PE-konjugiertem Streptavidin inkubiert worden waren.

2.3.7 Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA

MNC werden in 96-Loch-Rundboden-Platten in einer Dichte von 400,000 Zellen/Loch in der Gegenwart oder in Abwesenheit von OA oder Mitogen (10 nM Phorbol ester, 0.5 μ M Ionomycin) für 48 hrs bei 37°C inkubiert. Zytokin-Konzentrationen in den zellfreien Überständen oder in der BAL Lösung werden mittels ELISA unter Verwendung von Ratte-anti-Maus-Zytokin-Antikörpern (unkonjugiert für Beschichtung der Platte, konjugiert für Detektion des gebundenen Zytokins), wie für Ig ELISA beschrieben, bestimmt.

2.3.8 Bestimmung von zytoplasmatischen Zytokinen mittels FACS

Zytokin-Produktion auf der Einzel-Zellebene wird mittels zytoplasmatischer Anfärbung bestimmt. Milz MNC und PBLN-Zellen werden für 4 hrs mit Phorbol ester (10 nM) und Ionomycin (0.5 μ M) stimuliert, mit Saponin-Lösung (Sigma, 0.1% in HBSS) permeabilisiert, mit Ziegen- und Esel Ig geblockt und abschließend mit biotinylierten anti-IL-4, anti-IL-5 oder anti-IFN- γ Antikörpern (PharMingen) angefärbt, gefolgt von PE-konjugiertem Streptavidin. In einem zweiten Schritt werden FITC-konjugierte anti-CD4 und anti-CD8 Antikörper (PharMingen) zugesetzt. Die Frequenz positiver Zellen wird mittels eines Zytofluorographen (Coulter Electronics) bestimmt, die Fluoreszenz-Intensität wird mit Isotyp-Kontrollen, die den Isotypen der verwandten anti-Zytokin- Antikörpern gleichen, oder mit nicht stimulierten Zellen verglichen.

2.3.9 Broncho-alveoläre Lavage (BAL)

Lungen werden über einen trachealen Tubus dreimalig mit "Hank's balanced salt solution" (HBSS, 0.5 ml) gespült, die Zellen in der so gewonnenen Lavage in einem automatischen Zellzähler gezählt, und die BAL-Flüssigkeit nach Zentrifugieren (1000 rpm, 7 min, 4°C) von den BAL-Zellen getrennt.

2.3.10 Lungenzell-Isolierung

Die Lungen Zellen werden isoliert. Hierzu werden die Lungen nach Kollekte der BAL mit erwärmter (37° C) Calcium- und Magnesium-freier HBSS-Lösung mit 10% FCS, 0.6 mM EDTA, 100 U/ml Penicillin and 100 µg/ml Streptomycin über den rechten Herzventrikel mit einer Rate von 4 ml/ min über einen Zeitraum von 4 min gespült. Die Lungen werden entfernt und in ca. 300 µm große Teile zerschnitten. Die Lungenstückchen werden in 4 ml HBSS-Lösung mit 175 U/ ml Kollagenase (Typ IA, Sigma), 10% FCS, 100 U/ml Penicillin and 100 µg/ml Streptomycin gelöst und für 60 min auf einem Rüttler bei 37° C inkubiert. Die angesauten Lungen werden durch eine 20-g Nadel, danach durch ein 45 µm und ein 15 µm Sieb gefiltert und mit HBSS-Lösung mit 2% FCS gewaschen. Lungen- und BAL-Zellen werden in HBSS resuspendiert, gezählt und mit Leukostat (Fisher Diagnostics) für die Differentialzählung angefärbt. Die übrigen Zellen werden in destilliertem Wasser mit 1% NP-40 (Sigma) resuspendiert (2×10^5 Zellen/ ml) und bis zur Bestimmung der EPO-Aktivität bei -20°C aufbewahrt.

2.3.11 Bestimmung der Eosinophilen Peroxidase (EPO) Aktivität

Verwandt wird eine für die EPO der Eosinophilen spezifische Methode. 100 µl des Substrates (0.1 mM *o*-Phenyl-Diamin-Dihydrochlorid, 0.1% Triton X-100, 1 mM Hydrogen-Peroxid in 0.05 M Tris-HCl; alle Reagentien von Sigma) wird zu 100 µl der aufgelösten BAL- oder Lungenzellen (s.o.) gegeben und bei 37° C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 50 µl 4 M Schwefliger Säure gestoppt und die optische Dichte in einem ELISA Lesegerät bei einer Wellenlänge von 492 nm bestimmt.

2.3.12 Histologie

Lungengewebe wird für histologische Untersuchungen mit Formaldehyd lavagiert und in Formaldehyd fixiert. Randomisierte Schnitte der unteren, mittleren und oberen Atemwege werden mit Hämatoxylin/ Eosin (HE) für Licht-Mikroskopie angefärbt oder für die Elektron-Mikroskopische Untersuchung weiterverarbeitet.

2.3.13 Immunohistochemie (IHC)

Das Lungengewebe wird in 10% Formalin fixiert. Major basic protein (MBP) wird durch *in situ* IHC mit Kaninchen-anti-Maus-MBP Antikörper (Dr. Gleich, Rochester, MN) lokalisiert. Gewebeblöcke der linken Lunge wurden um den Hauptbronchus herum ausgeschnitten und in Paraffin eingebettet. 5 µm dicke Schnitte werden auf einem Objektträger fixiert, deparaffinisiert und in normalem Kaninchenserum bei 37°C für 2 h inkubiert. Die Schnitte werden daraufhin entweder mit anti-MBP oder, zur Kontrolle, mit normalem Kaninchenserum angefärbt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen und 30 min Inkubation in 1% Chromotrop 2R (Harleco, Philadelphia) werden die Schnitte mit FITC-konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen-IgG für 30 min bei 37°C gegen gefärbt. Die angefärbten Präparate werden durch einen unabhängigen Mitarbeiter in einem Zeiss Fluoreszenz Mikroskop ausgewertet. Die Anzahl von Eosinophilen, die pro mm² Submukosa um die zentralen Bronchien und Bronchiolen angetroffen werden, wird mittels des IP-Lab2 Software-Programmes (Signal Analytics, Vienna, VA) bestimmt.

2.3.14 *In situ* Hybridisierung mittels RT-PCR

Die RNA von 10-30 Millionen Zellen (SC, PBLN, Lungenzellen) wird durch die Guanidin-Isozyanat-Methode isoliert. Die RNA wird bei 260 nm spektrophotometrisch gemessen und in Aliquots bei -20° C gelagert. Die RNA der einzelnen Proben wird in RT-Pufferlösung (AMV reverse transcriptase, oligo dT, dNT, BSA, RNAGuard, Pharmacia) zu cDNA umgeformt. cDNA wird bei -20°C gelagert. Der Gehalt an cDNA für die einzelnen Zytokine wird durch semi-quantitative RT-PCR bestimmt. Nach initialer Denaturierung werden bis zu 29 PCR Zyklen durchgeführt. Die Proben werden auf Agarose Gel in Glycerin-Puffer mit Ethidium-Bromid angefärbt. Unter UV-Licht werden Fotografien angefertigt und die Dichte von parallel gelaufenen Marker-Fragmenten gegen das Molekulargewicht berechnet, um die Ausbeute an PCR Target-Fragmenten zu bestimmen. Ergebnisse werden in Prozent β-Aktin mRNA Kopien angegeben.

2.4 Datenanalyse

Für den Vergleich individueller Gruppen wird der t-Test zur Bestimmung von Signifikanz verwendet. Bei multiplen Vergleichen wird ANOVA angewandt. Für den Vergleich von AR in multiplen Gruppen wird der Tukey Kramer HSD benutzt. Die Schwelle für Signifikanz wird bei 5 % angesetzt. Für jedes Experiment ist eine minimale Gruppenstärke von 8-10 Mäusen vorgesehen, diese wird in drei voneinander unabhängigen Experimenten erreicht. Die Ergebnisse werden als Durchschnitt \pm SD für ELISA und Histologie und als Durchschnitt \pm SEM für AR angegeben.

3. Kapitel

Ergebnisse

3.1 Ergebnisse im Modell der Atemwegs-Sensibilisierung

- 1 Hamelmann E, Oshiba A, Bradley K, Loader J, Larsen G, Potter T, Gelfand E. REQUIREMENT FOR CD8 T CELLS IN THE DEVELOPMENT OF AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS IN A MURINE MODEL OF AIRWAY SENSITIZATION. *J. Exp. Med.* 1996; 183:1719-1730.
- 2 Hamelmann E, Oshiba A, Coffman R, Lee J, Larsen K, Gelfand E. ANTI-INTERLEUKIN-5 ANTIBODY PREVENTS AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS IN A MURINE MODEL OF AIRWAY SENSITIZATION. *Am. J. Crit. Care Resp. Med.* 1997; 155: 819-825.
- 3 Schwarze J., E Hamelmann, KL Bradley, K Takeda, EW Gelfand. RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS INFECTION RESULTS IN AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS AND ENHANCED AIRWAY SENSITIZATION TO ALLERGEN. *J. Clin. Invest.* 1997; 100: 226-233.

3.1.1 Das Modell der Atemwegs-Sensibilisierung

3.1.1.1 Einführung

Der genaue Mechanismus der Entstehung von AHR ist unbekannt. Um Untersuchungen zum besseren Verständnis von Allergen-induzierten Veränderungen der Atemwegs-Funktion durchzuführen, sind Studien an Tiermodellen unerlässlich. Die Maus bietet sich hierfür wegen ihrer gut definierten Immunologie und dem Vorhandensein genetisch alterierter und gut charakterisierter Stämme besonders an. Die herkömmliche Methode zur experimentellen Sensibilisierung von Mäusen besteht in der systemischen Gabe von Allergen im Kontext mit Adjuvantien. Das Problem hierbei ist, dass Adjuvantien *per se* bereits zu Veränderungen der T-Zell- und anderer zellulärer Funktionen und zur Induktion von inflammatorischen Immunantworten führen können. Um diesen unspezifischen Effekt auszuschließen und um dem “normalen” Weg der Sensibilisierung mit inhalativen Allergenen, wie z.B. Pollen oder Hausstaubmilbenallergen, möglichst nahe zu kommen, wurde ein Modell der Atemwegs-Sensibilisierung etabliert. Hierbei werden die Mäuse durch repetitive Vernebelung von allergenhaltiger Lösung ohne den Zusatz von Adjuvantien sensibilisiert. Bei der Partikelgröße des Aerosols (>95 % der Partikel 1-2 µm) wurde beachtet, dass die kleinen und mittleren Atemwege der Maus erreicht werden. Bei der Festlegung des Sensibilisierungs-Protokolls wurden als Parameter eine möglichst hohe allergen-spezifische IgE-Produktion bei nur geringer IgG-Produktion und die Entwicklung von AHR gewählt.

3.1.1.2 Protokolle

1) Tiere:

Weibliche BALB/c Mäuse (Jackson) von 6 bis 12 Wochen Alter, keimfrei und mit OA-freier Nahrung gehalten.

2) Atemwegs-Sensibilisierung:

Die BALB/c Mäuse werden an 10 aufeinander folgenden Tagen täglich für 20 min in einer abgeschlossenen Plastikbox mit Allergen (OA 1% in PBS) vernebelt. Kontrollen wurden zu gleicher Zeit mit PBS vernebelt. Ein Tag nach Abschluß des Sensibilisierungs-Protokolls, am Tag 11, wurde die kutane Hypersensibilität nach intradermaler Applikation von Allergen getestet. Zwei Tage nach Abschluß des Sensibilisierungs-Protokolls, am Tag 12, wurden die Mäuse getötet und die Atemwegs-Funktion durch EFS von isolierten trachealen Segmenten bestimmt. Serumspiegel für Gesamt-IgE und IgG und allergen-spezifische Antikörper wurden per ELISA bestimmt (Abbildung 3.1.1).

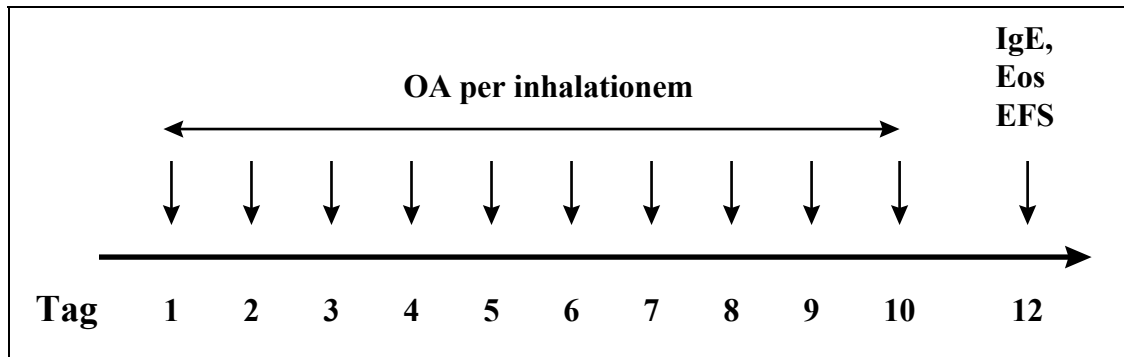


Abbildung 3.1.1: Protokoll der Atemwegs-Sensibilisierung

3.1.1.3 Ergebnisse

1) Ig Produktion:

Atemwegs-Sensibilisierung durch das 10-Tage-Verneblungs-Protokoll mit OA-Aerosol führte zu signifikanter Produktion von allergen-spezifischem IgE (293 ± 29 EU) und IgG1 (1250 ± 330 EU), nicht jedoch zu anderen Isotypen. Der Serumspiegel von Gesamt-IgE und IgG wurde durch diese Form der Sensibilisierung nicht signifikant beeinflusst.

2) Kutane Hypersensibilität:

Intradermale Injektion von OA ein Tag nach Abschluß der Atemwegs-Sensibilisierung führt in der Mehrzahl der Tiere (10/12) zu positiven Hautreaktionen innerhalb von 15 min. Bei den Kontrollen war bei keinem Tier eine positive Reaktion zu beobachten (0/8, $p < 0.01$ vs OA). Dies spricht für das Vorliegen von spezifischer kutaner Hypersensibilität vom Soforttyp (ICH) nach Atemwegs-Sensibilisierung mit OA.

3) AHR:

2 Tage nach Abschluß des Sensibilisierungs-Protokolls wurde *in vitro* die AR durch EFS von isolierten trachealen Segmenten bestimmt. Verglichen wurden die Frequenzen, die zur halb-maximalen Kontraktion der glatten Muskulatur geführt hatten (ES_{50}). Bei den Kontrolltieren (PBS) lagen die Werte bei 4.0 ± 0.3 Hz, bei den sensibilisierten Tieren (OA) bei 2.2 ± 0.4 Hz ($p < 0.01$ vs PBS). Die signifikante Verminderung der Frequenzen, die zur halb-maximalen Kontraktion der glatten Muskulatur nach Stimulation mit EFS führten, in der Gruppe der Atemwegs-sensibilisierten Mäuse kann als Zeichen für die Entwicklung von AHR gedeutet werden.

3.1.2 CD8 Depletion vor Atemwegs-Sensibilisierung

3.1.2.1 Einführung

Die leukozytäre Infiltration der Atemwege wird als maßgebliche Voraussetzung für die Entwicklung von AHR angesehen. Hierbei kommt es besonders zur Akkumulation von Eosinophilen und T-Zellen. Es gibt zunehmende Hinweise für eine zentrale Rolle von T-Zellen bei der Ausbildung von allergischer Atemwegs-Entzündung und AHR. Zum ersten steht die bei allergischen Patienten beobachtete erhöhte IgE-Produktion unter der Kontrolle von T-Zell-Zytokinen, IL-4 und IL-13. Zum zweiten wird die Reifung, Differenzierung, Aktivierung und das Überleben von Eosinophilen, den maßgeblichen Effektorzellen der allergischen Entzündung, durch das T-Zell-Zytokin IL-5 wesentlich unterstützt. Entsprechend weisen CD4⁺ T-Helferzellen aus bronchialen Biopsaten oder broncho-alveolären Lavagen von asthmatischen Patienten erhöhte Werte von mRNA für die Produktion von Th2-Zytokinen IL-4 und IL-5 auf.

Im Gegensatz zur gut definierten Rolle von CD4⁺ T-Helferzellen bleibt die Rolle von CD8 T-Zellen in der allergischen Reaktion weniger klar. Ursprüngliche Beobachtungen verbanden eine verminderte T-Suppressorfunktion von CD8 Zellen mit der Entwicklung von allergischer Rhinitis, Dermatitis und Asthma bronchiale. So konnte eine Verminderung von peripheren CD8⁺ Suppressorzellen als mögliche Ursache bei Patienten mit Asthma und Rhinitis gefunden werden. Auf der anderen Seite wurde bei Patienten mit Asthma bronchiale eine Zunahme an CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut und der BAL beobachtet, und eine Infiltration von bronchialen Gewebe mit CD8⁺ Zellen wurde für verschiedene Tiermodelle beschrieben. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass separierte CD8⁺ Zellen von asthmatischen Patienten *in vitro* IL-5 produzieren und das Überleben von Eosinophilen verlängern. Jüngere Arbeiten unterstützen die Existenz von Th2-ähnlichen CD8⁺ Zellen, die IL-4, IL-5 und IL-10, nicht aber IFN oder IL-2 produzieren.

Ziel der vorliegenden Studie war, die Rolle von CD8⁺ T-Zellen bei der IgE-Produktion, eosinophilen Infiltration der Atemwege und Entwicklung von AHR bei allergisch sensibilisierten BALB/c Mäusen genauer zu definieren. Wir benutzten ein Modell der selektiven Depletion von CD8⁺ T-Zellen *in vivo* und *in vitro* sowie der

selektiven Rekonstitution von CD8-depletierten Tieren mit CD8 angereicherten oder depletierten Milzzellen. Wir zeigen hier, dass CD8 Zellen eine wesentliche Rolle für die Entwicklung von eosinophiler Atemwegs-Entzündung und AHR spielen und an der lokalen IL-5 Produktion durch PBLN maßgeblich beteiligt sind.

3.1.2.2 Protokolle

1) Tiere:

Keimfreie weibliche BALB/c Mäuse im Alter von 3-12 Wochen.

2) CD8-T-Zell-Depletion in vivo:

3-4 Wochen alte Mäuse wurden in voller Narkose durch Absaugen des Thymus nach Eröffnung über medianen Längsschnitt am Hals thymektomiert (Tag - 23). Zwei Wochen später wurden die Mäuse ip mit 200 µl aus Aszites-Überstand des Hybridoms YTS 169 (Ratten IgG anti-Maus-CD8, ATCC) injiziert (Tag -9). Die Spezifität und optimale Verdünnung des Antikörpers wurden *in vivo* und *in vitro* bestimmt. Die Injektion wurde nach 3 und nach 6 Tagen wiederholt.

Kontrollen wurden zu den gleichen Zeitpunkten mit 0.2 mg von normalem Ratten IgG (Sigma) behandelt. In Vorversuchen wurde ein Effekt von Schein-Thymektomie ohne Antikörperbehandlung ausgeschlossen.

Die CD8-depletierten (CD8 depl) und die Kontrolltiere (OA ctrl) wurden 3 Tage nach der letzten Injektion über die Atemwege an 10 aufeinander folgenden Tagen (Tag 1-10) sensibilisiert und die Untersuchungen der AR 2 Tage nach Abschluß der Sensibilisierung (Tag 12) durchgeführt (Abbildung 3.2). Negative Kontrollen waren mit PBS schein-sensibilisierte Tiere (PBS ctrl).

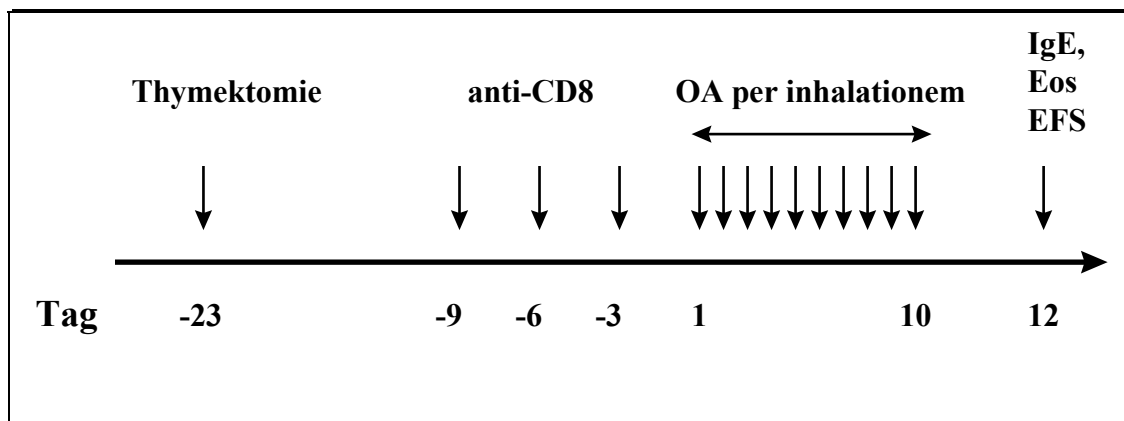


Abbildung 3.1.2: Protokoll der CD8-Depletion.

3) Transferversuche:

Aus Milzen von naiven, nicht-sensibilisierten Spender-Mäusen wurden über magnetische Partikel (Miltenyi) positiv die $CD8^+$ T-Zellen selektiert. Die selektionierte Fraktion enthielt in der FACS-Analyse $> 95\%$ $CD8^+$ Zellen, die depletierte Fraktion $< 1\%$ $CD8^+$ Zellen.

CD8-depletierte Mäuse wurden am Tag 8 des Sensibilisierungs-Protokolls mit 1×10^7 selektierten $CD8^+$ Zellen intravenös behandelt (CD8 trf). Kontrollen erhielten die gleiche Anzahl an CD8-depletierten Milzzellen zum gleichen Zeitpunkt.

4) CD8-T-Zell-Depletion *in vitro*:

PBLN-Zellen von nicht-CD8-depletierten Mäusen wurden nach Abschluß der Atemwegs-Sensibilisierung am Tag 12 vor *in vitro* Kultur zur Bestimmung der Zytokin-Produktion von CD8-Zellen *in vitro* depletiert.

3.1.3 Anti-IL-5 Antikörper vor Atemwegs-Sensibilisierung

3.1.3.1 Einführung

AHR ist ein kardinales Charakteristikum von Asthma bronchiale. Der genaue Mechanismus für die Entwicklung von AHR ist unbekannt, und viele Faktoren können daran beteiligt sein. Es gibt zunehmend Hinweise für eine maßgebliche Rolle von Eosinophilen bei der Ausbildung von erhöhter AR. Eosinophile finden sich vermehrt in bronchialen Biopsaten und Broncho-alveolären Lavagen von Patienten mit Asthma bronchiale, und die Anzahl der Eos korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung. Die eosinophile Entzündung wird mit der Produktion von IL-5 in Verbindung gebracht, dem wichtigsten Faktor für die terminale Differenzierung, Reifung und Aktivierung von Eos. Um den direkten Einfluß von IL-5 untersuchen zu können, wurden Tiermodelle eingesetzt. In Modellen von Meerschweinchen und Primaten konnten anti-IL-5 Antikörper die eosinophile Infiltration verhindern und die Entwicklung von AHR blockieren. In Maus-Modellen für AHR ist die Rolle von IL-5 umstritten. In zwei Studien wurden anti-IL-5 Antikörper bei allergensensibilisierten BALB/c Mäusen eingesetzt, aber trotz deutlicher Reduktion der allergischen eosinophilen Entzündung konnte kein Einfluß auf die Entwicklung von AHR gefunden werden, so dass von einem von Eosinophilie unabhängigen Mechanismus ausgegangen werden mußte. Im Gegensatz zeigen C57BL/6 Mäuse, die genetisch für die Produktion von IL-5 defizient sind, im Anschluß an allergische Sensibilisierung und Atemwegs-Provokation weder eosinophile Entzündung noch Entwicklung von AHR. Die Unterschiede der Ergebnisse könnten durch die zwei unterschiedlichen Mausstämme der Studien begründet sein, die einen differenten Mechanismus bei der Entwicklung von AHR nach sich ziehen könnten.

Ziel der folgenden Studie war, die Rolle von IL-5-vermittelter eosinophiler Infiltration der Atemwege bei der Entwicklung von AHR nach Atemwegs-Sensibilisierung von BALB/c Mäusen zu untersuchen. Weiter sollte der Einfluß der anti-IL-5 Antikörperbehandlung auf immunologische Reaktionen von T-Zellen (Proliferation, Zytokin-Produktion), B-Zellen (Ig Produktion) und Mastzellen (kutane Hypersensibilität) nach allergischer Sensibilisierung untersucht werden. Dies ist die Erstbeschreibung der wirksamen Verhinderung von eosinophiler Infiltration der

Atemwege und Entwicklung von AHR durch anti-IL-5 Antikörperbehandlung in allergensensibilisierten BALB/c Mäusen.

3.1.3.2 Protokolle

1) Tiere:

Weibliche BALB/c Mäuse, 8 bis 12 Wochen alt, keimfrei und unter OA-freier Diät.

2) Anti-IL-5-Antikörper-Behandlung:

Je vier Mäuse pro Gruppe und Experiment wurden über 10 Tage über die Atemweg sensibilisiert. Die negativen Kontrollen erhielten statt OA PBS als Aerosol (PBS). Die Versuchsgruppe erhielt 100 µg anti-IL-5 Antikörper (Ratte-anti-Maus IgG, TRFK-5) in 200 µl PBS intravenös an den Tagen 4, 6 und 8 des 10-Tage-Sensibilisierungs-Protokolls (OA/ TRFK5). Gleichaltrige Mäuse in der positiven Kontrollgruppe erhielt gleiche Dosen von Normalem Ratten-IgG zu gleichen Zeitpunkten (OA/ IgG). AR wurde am Tage 12, 2 Tage nach Abschluß der Sensibilisierung, über EFS *in vitro* bestimmt (Abbildung 3.1.3).

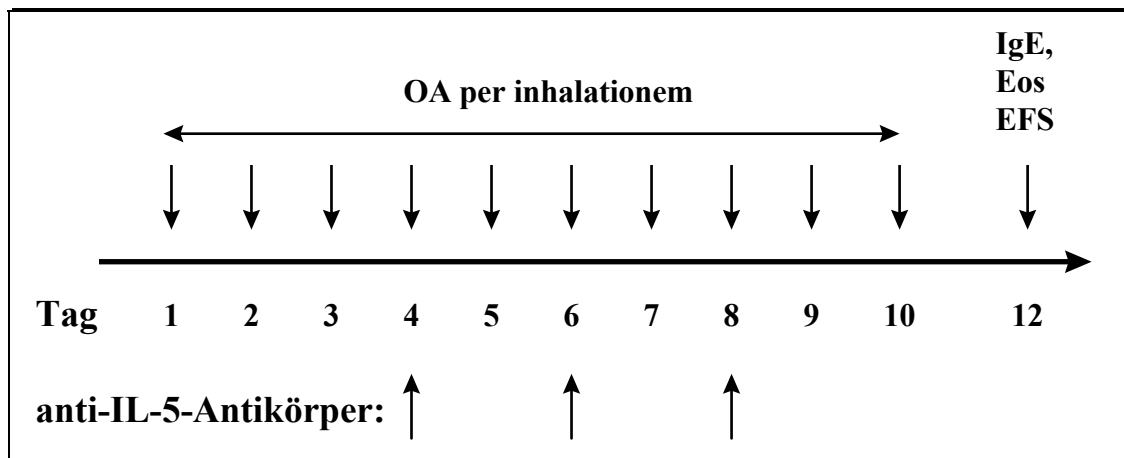


Abbildung 3.1.3: Protokoll der anti-IL-5 Antikörperbehandlung.

3.2 Ergebnisse im Modell der passiven Sensibilisierung

- 4 Oshiba A, Hamelmann E, Takeda K, Bradley K, Loader J, Larsen G, and Erwin W. Gelfand. Passive Transfer of Immediate Hypersensitivity and Airway Hyperresponsiveness by Allergen-specific Monoclonal IgE and IgG1 but not IgG2a or IgG3 Antibodies in Mice. *J. Clin. Invest.* 1996; 97 (6): 1398-1408.
- 5 Hamelmann E, Oshiba A, Schwarze J, Bradley K, Loader J, Larsen G, Potter T, Gelfand E. allergen-Specific IgE and IL-5 are essential for the development of airway hyper-responsiveness. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 1997; 16: 674-682.
- 6 Hamelmann E, Vella AT, Oshiba A, Marrack P, Gelfand EW. Allergic Airway Sensitization induces t-cell activation but not airway hyperresponsiveness in B-cell deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94:1350-1355.

3.2.1 Passive Sensibilisierung mit IgE und IgG1

3.2.1.1 Einführung

Es gilt als gesichert, dass die IgE-vermittelte Mastzell-Aktivierung der wesentliche Auslöser bei der Entstehung der allergischen (anaphylaktischen) Sofortreaktion darstellt, die bei weiterem Allergen-Kontakt in chronische Atemwegs-Entzündung und die Entwicklung von AHR übergehen kann. Der genaue Zusammenhang zwischen der IgE-vermittelten Sofortreaktion und der durch die Entzündung hervorgerufenen AHR ist jedoch unklar. Sowohl bei Patienten mit Asthma bronchiale als auch in Tiermodellen der AHR wird parallel zur IgE-Produktion die Entstehung von Asthmasymptomen bzw. AHR beobachtet, ohne dass dies einen kausalen Zusammenhang beweist. Um die Interaktion zwischen allergischen Immunreaktionen, ausgelöst durch allergen-spezifisches IgE (und IgG), mit der Entwicklung von erhöhter AR genauer untersuchen zu können, entwickelten wir B-Zell-Hybridome, die OA-spezifische Ig sezernieren. Durch passive Sensibilisierung mit anti-OA Antikörpern und nachfolgende Allergen-Provokation (intradermal, systemisch, inhalativ) konnte der Einfluß von allergen-spezifischem IgE und IgG-Subklassen auf die Entwicklung von Anaphylaxie und AHR untersucht werden. Die Studie zeigt, dass mehrfache Injektionen von anti-OA IgE oder IgG1, gefolgt von mehrfachen Allergen-Provokationen der Atemwege, zu Atemwegs-Entzündung und AHR führen.

3.2.1.2 Protokolle

1) Tiere:

Weibliche BALB/c Mäuse, 8 bis 12 Wochen alt, keimfrei und unter OA-freier Diät.

2) Protokolle:

Passive Sensibilisierung mit anti-OA IgE, IgG1, IgG2a oder IgG3 (2 µg in 200 µl PBS, iv) an den Tagen 1, 2 und 3 des Protokolls. Kontrollen erhielten gleiche Mengen von entsprechenden anti-TNP Ig-Subklassen zu den gleichen Zeitpunkten. Atemwegs-Provokation mit Allergen (OA 1% in PBS, 20 min tgl.) beginnend drei Tage nach der letzten Injektion, an den Tagen 6, 7 und 8. Messung von *in vitro* AR nach EFS von trachealen Segmenten 2 Tage nach der letzten Provokation, am Tag 10 des Protokolls (Abb. 3.2.1). Positive Kontrollen waren systemisch sensibilisierte und atemwegsprovozierte Mäuse (Protokoll siehe 3.3.1).

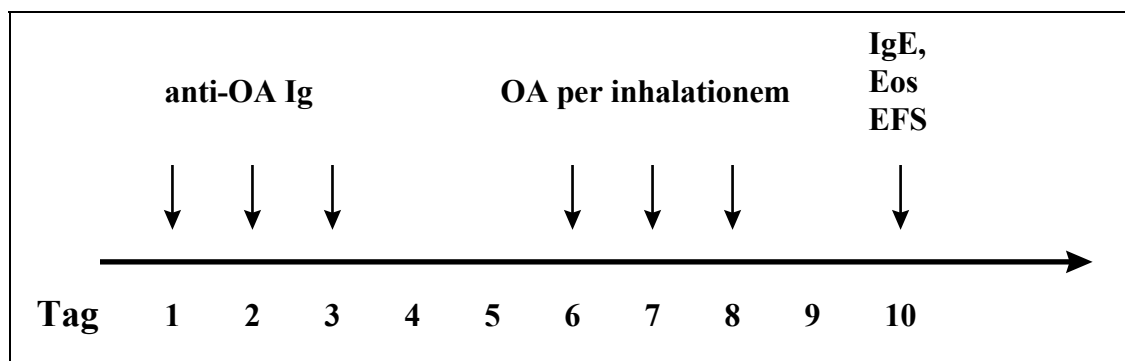


Abbildung 3.2.1: Protokoll der passiven Sensibilisierung mit anti-OA Ig

3.2.2 Passive Sensibilisierung von Nacktmäusen

3.2.2.1 Einführung

Es wird angenommen, dass die Produktion von allergen-spezifischem IgE ein zentraler Mechanismus bei der Entwicklung von AHR und Atemwegs-Entzündung darstellt. Erhöhte IgE Serumspiegel werden bei Patienten mit Asthma bronchiale gefunden und korrelieren mit dem Schweregrad der Erkrankung. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die IgE-vermittelte Mastzell-Aktivierung für die Entwicklung von AHR und die Anwesenheit von IgE für die eosinophile Atemwegs-Infiltration Voraussetzungen darstellen. Diese eosinophile Infiltration wird wiederum als wesentliche strukturelle Voraussetzung für die Entstehung von AHR angesehen. Bislang ist es unmöglich, den Einfluß von und die Beziehung zwischen IL-5 und IgE-Produktion bei der Entstehung von AHR zu definieren. Im Rahmen der allergischen Sensibilisierung kommt es zu einer Th2-Antwort, die sowohl mit erhöhter IL-4 und IgE-Produktion als auch mit erhöhter IL-5-Produktion und eosinophiler Atemwegs-Entzündung einhergeht. Ziel der folgenden Studie war, die Notwendigkeit von T-Zellen, T-Zell-Produkte und allergen-spezifischem IgE für die Entstehung von AHR getrennt zu analysieren. Wir bedienten und athymischen, T-Zell-defizienten Nacktmäusen und der passiven Sensibilisierung mit allergen-spezifischem IgE, um die T-Zellantwort von der IgE-Produktion zu trennen. Wir zeigen, dass passive Sensibilisierung von athymischen Mäusen nicht zu AHR führt, obwohl allergische Sofortreaktionen wie die ICH möglich sind. Erst die zusätzliche Behandlung von passiv sensibilisierten athymischen Mäusen mit IL-5 vor den Atemwegs-Provokationen mit Allergen führt zu signifikanter eosinophiler Atemwegs-Entzündung und Entwicklung von AHR.

3.2.2.2 Protokolle

1) Tiere:

Weibliche BALB/c und T-Zell-defiziente, athymische, “nackte” BALB/c Mäuse (Jackson) im Alter von 8-12 Wochen, keimfrei und unter OA-freier Diät.

2) Protokolle:

Normale (*BALB/ OA-IgE*) und athymische (*nu/ OA-IgE*) Mäuse (3-4 pro Gruppe und Experiment) wurden passiv durch iv Injektion von anti-OA IgE (0.4 µg in 200 µl PBS) an den Tagen 1, 2 und 3 sensibilisiert. Kontrollen erhielten gleiche Mengen und Konzentrationen von anti-TNP IgE zu gleichen Zeitpunkten (*BALB/ TNP-IgE*). Gruppen von athymischen Mäusen wurden mit IL-5 (20 ng) zusätzlich zur passiven Sensibilisierung iv an den Tagen 1 bis 3 behandelt (*nu/OA-IgE/IL-5*) (Abbildung 3.2.2). Die passiv sensibilisierten Mäuse wurden, beginnend am dritten Tag nach der letzten Injektion, an den Tagen 6 und 7 des Protokolls mit OA als Aerosol (1% in PBS) jeweils für 20 min über die Atemwege provoziert. Eine positive Kontrollgruppe wurde über 10 Tage nach dem Protokoll der Atemwegs-Sensibilisierung behandelt. AR wurde zwei Tage nach der letzten Provokation, am Tag 9, durch EFS von trachealen Segmenten *in vitro* bestimmt.

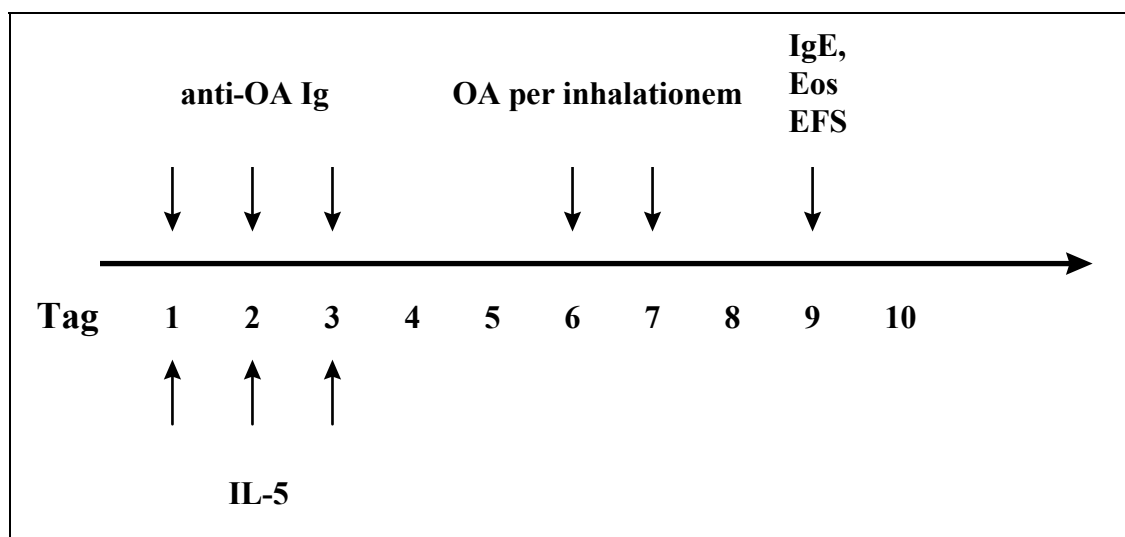


Abbildung 3.2.2: Protokoll der passiven Sensibilisierung von Nackmäusen

3.2.3 Passive Sensibilisierung von B-Zell-defizienten-Mäusen

3.2.3.1 Einführung

Die allergische Reaktion bei atopischen Patienten ist durch die Produktion ungewöhnlich hoher Mengen an allergen-spezifischem IgE als Reaktion auf den Kontakt mit Umwelt-Antigenen gekennzeichnet. IgE Serumspiegel korrelieren mit der Prävalenz und der Schwere der Erkrankung bei Patienten mit Asthma bronchiale. Die IgE-vermittelte Mastzell-Aktivierung setzt einerseits im Rahmen der allergischen Sofortreaktion pro-inflammatorische Mediatoren, wie Histamin, PG und LT, frei; andererseits können Mastzellen aber auch Quelle von Th2-Zytokinen, wie IL-4 und IL-5, sein und so in die Regulation von IgE-Produktion und eosinophiler Entzündung eingreifen. Neben ihrer Rolle bei der IgE-Produktion haben B-Zellen jedoch eine zweite wichtige Funktion in der allergischen Reaktion. Über den niedrig-affinen IgE-Rezeptor, CD23, stellen B-Zellen wichtige Effektorzellen bei der IgE-vermittelten Anregung von T-Zellfunktionen dar. *In vitro* dienen sie der CD23-vermittelten Antigen-Fokussierung auf T-Zellen; *in vivo* zeigen CD23-defiziente Mäuse verminderte Anregung der Ig-Produktion nach IgE-Aktivierung, und anti-CD23-behandelte Tiere weisen verminderte IgE-Produktion und eosinophile Entzündung auf.

Um die Rolle von B-Zellen und IgE bei der Entwicklung von allergen-induzierter AHR und Atemwegs-Entzündung zu genauer untersuchen, führten wir aktive und passive Sensibilisierung in B-Zell-defizienten (BCD) Mäusen durch. Dies erlaubt, die Bedeutung von B-Zellen und allergen-spezifischem IgE für die allergische Reaktion getrennt zu definieren. Die folgend beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass Atemwegs-Sensibilisierung von BCD Mäusen zu signifikanter T-Zell-Aktivierung und eosinophiler Infiltration der Atemwege, nicht jedoch zu AHR führt. Passive Sensibilisierung mit allergen-spezifischem IgE stellte die Entwicklung von AHR wieder her, was auf die wesentliche Rolle von IgE für die Entstehung von erhöhter AR in diesem Modell der Sensibilisierung schließen läßt.

3.2.3.2 Protokolle

1) Tiere:

Weibliche B10.BR Mäuse (Jackson) im Alter von 8 bis 12 Wochen. B-Zell-defiziente (BCD) B10.BR Mäuse ($\mu\text{Mt}^{-/-}$) über fünf Generationen auf B10.BR Wildtyp zurück gekreuzt. Milzen und Lymphknoten der BCD wiesen $<3\%$ B220⁺ Zellen, der Wildtyp 70% B220⁺ in Milzen, $>30\%$ in Lymphknoten. Alle Mäuse keimfrei und unter OA-freier Diät.

2) Sensibilisierung und Antikörperbehandlung:

Normale (*B10.BR/OA*) und BCD ($\mu\text{Mt}/OA$) Mäuse (3-4 pro Gruppe und Experiment) wurden über die Atemwege mit OA (1% in PBS) an 10 aufeinander folgenden Tagen sensibilisiert. Kontrollen erhielten PBS Aerosol (*B10.BR/PBS*). In einer Gruppe erhielten die BCD anti-OA IgE (0.4 μg in 200 μl PBS) iv an den Tagen 4, 6 und 8 des 10-Tage Protokolls ($\mu\text{Mt}/\text{IgE}$) (Abbildung 3.2.3). Gleichaltrige Kontrollen erhielten gleiche Mengen anti-TNP IgE zu den gleichen Zeitpunkten. (In allen Untersuchungen ergaben sich keine Unterschiede zwischen OA sensibilisierten Mäusen mit oder ohne anti-TNP IgE Behandlung.) AR wurde *in vitro* nach EFS von trachealen Segmenten bestimmt.

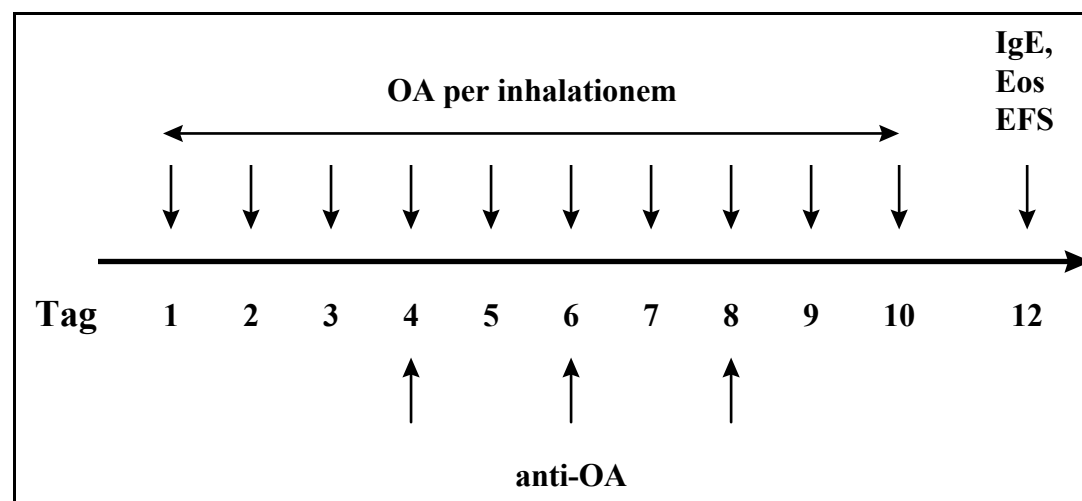


Abbildung 3.2.3: Protokoll der passiven Sensibilisierung von B-Zell-defizienten Mäusen

3.3 Ergebnisse im Modell der systemischen Sensibilisierung

- 7 Hamelmann E., J. Schwarze, K. Takeda, A. Oshiba, G.L. Larsen, C.G. Irvin, E.W. Gelfand. NONINVASIVE MEASUREMENT OF AIRWAY RESPONSIVENESS IN ALLERGIC MICE USING BAROMETRIC PLETHYSMOGRAPHY. *Am. J. Crit. Care Resp. Med.* 1997;156:766-775.
- 8 Hamelmann E, Vella AT, Kappler J, Marrack P, Gelfand EW. Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness requires interleukin-5 but not immunoglobulin E or B lymphocytes [see comments]. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999 Oct 1;21(4):480-489.
- 9 Takeda K, Hamelmann E, Joetham A, Shultz L, Irvin C, Gelfand EW. DEVELOPMENT OF AIRWAY EOSINOPHILIA AND AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS IN ALLERGEN-SENSITIZED MAST CELL DEFICIENT MICE. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 449-454.
- 10 Hamelmann E, Takeda K, Haczku A, Cieslewicz G, Shultz LD, Hamid QA, Xing Z, Gauldie J, and Gelfand EW. IL-5 BUT NOT IGE RECONSTITUTES AIRWAY INFLAMMATION AND HYPERRESPONSIVENESS IN IL-4 DEFICIENT MICE. *Am.J Respir.Cell Mol.Biol.* 2000;23:327-334.
- 11 Hamelmann E, Cieslewicz G, Schwarze J, Ishizuka T, Joetham A, Heusser C, Gelfand E. Anti-Interleukin 5 but not Anti-Immunoglobulin E Treatment Prevents Airway Inflammation and Hyperresponsiveness in a Mouse Model of Allergic Sensitization. *Am. J. Crit. Care Resp. Med.* 1999;160: 934-941.

3.3.1 Das Modell der systemischen Sensibilisierung

3.3.1.1 Einführung

Zwei generelle unterschiedliche Ansätze sind benutzt worden, um Veränderungen der Atemwegs-Funktion bei Mäusen feststellen zu können: die *in vitro* Messung der Kontraktilität der glatten trachealen Muskulatur nach EFS und die invasive *in vivo* Messung des Atemwegswiderstandes nach intravenöser Injektion von bronchokonstriktiven Stimuli. Beide Methoden haben ihre Limitationen. Die *in vitro* Technik korreliert gut mit allergischer Sensibilisierung und reflektiert wahrscheinlich eine Zunahme der Acetylcholin-Freisetzung aufgrund einer Fehlfunktion der muscarinen M₂-Rezeptoren. Einflüsse der tiefen Atemwege, wie z.B. erhöhte Schleimproduktion, Ödematisierung oder Atemwegsumbau nach allergischer Sensibilisierung werden jedoch durch diese Methode nicht erfaßt. Die *in vivo* Technik setzt die Narkotisierung und Ventilation der Tiere voraus. Der Einfluß von Anästhesie und operativer Tracheostomie auf die Messung ist dabei schwer abzuschätzen. Weiterhin reflektiert die iv Gabe des Bronchokonstriktors kaum die physiologische Stimulation der glatten Atemwegs-Muskulatur. Schließlich ist die Technik sehr zeit- und arbeitsaufwendig und kann nur durch speziell ausgebildetes Personal unter erheblichem Aufwand durchgeführt werden.

Im folgenden werden die Ergebnisse einer Studie dargestellt, bei der Veränderungen der Atemwegs-Funktion erstmalig an nicht anästhesierten, spontan atmenden Mäusen nach allergischer Sensibilisierung und Atemwegs-Provokation mittels barometrischer Plethysmographie (WBP) gemessen werden. WBP weist dabei gegenüber den herkömmlichen Methoden mehrere Vorteile auf: es ist technisch nicht aufwendig, gestattet die Messung von AR nach Stimulation mit inhalativen Bronchokonstriktoren und erlaubt mehrfache und Langzeit-Messungen von AR für die Beurteilung von Kinetik und Behandlungsprotokollen der AHR. Da es sich bei WBP um eine indirekte, nicht invasive Messung handelt, müssen sorgfältige Versuche zur Validierung durchgeführt werden, bevor die Technik zur Bestimmung von AHR allgemein anerkannt werden kann. Der Einfluß der AHR der oberen Luftwege und von Atemfrequenz und AZV auf die Messungen in WBP mußten untersucht werden. Weiter mußte das Verhältnis von WBP zu der invasiven Messung des

Lungenwiderstandes bestimmt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass WBP eine valide und reproduzierbare Methode darstellt, erhöhte AR nach allergischer Sensibilisierung und Atemwegs-Provokation zu bestimmen.

3.3.1.2 Protokolle

1) Tiere:

Weibliche BALB/c Mäuse (Jackson) im Alter von 8-12 Wochen, keimfrei und unter OA-freier Diät.

2) Protokoll:

Systemische Sensibilisierung (OA 20 µg in 2 mg Alum, ip.) an den Tagen 1 und 14, Atemwegs-Provokation mit Allergen (OA 1% in PBS, 20 min tgl.) an den Tagen 28, 29 und 30 (ipNeb). Kontrollen waren nicht-sensibilisierte, nicht provozierte (N), sensibilisierte, nicht provozierte (ip) und nicht-sensibilisierte, provozierte (Neb) Mäuse. Messung der *in vivo* AR durch barometrische Plethysmographie (WBP) nach Stimulation mit ansteigenden Dosierungen von MCh (3 - 50 mg/ml in PBS) 2 Tage nach der letzten Provokation, am Tag 32 (Abbildung 3.3.1).

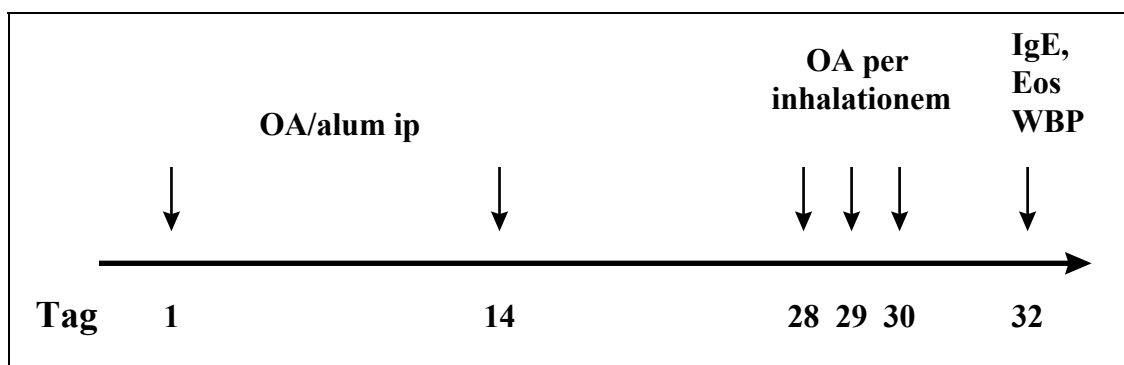


Abbildung 3.3.1: Protokoll der systemischen Sensibilisierung

3.3.2 Systemische Sensibilisierung von B-Zell-defizienten Mäusen

3.3.2.1 Einführung

Wie unter 3.2.3.1 ausgeführt fällt den B-Lymphozyten als Produzenten von Ig und besonders IgE bei der allergischen Immunreaktion eine Schlüsselrolle zu. Um die Bedeutung von B-Zellen bei der Ausbildung von allergenstimulierter Atemwegs-Entzündung und *in vivo* AHR im Modell der systemischen Sensibilisierung zu untersuchen, wurden B-Zell-defiziente Mäuse eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die eosinophile Infiltration der kleinen und mittleren Atemwege und die Ausbildung von erhöhter AR nach Provokation mit MCh in normaler Höhe in vollständiger Abwesenheit von B-Zellen oder Ig entwickeln können.

3.3.2.2 Protokolle

1) Tiere:

Weibliche normale B10.BR Mäuse (Jackson) und B-Zell-defiziente (BCD) B10.BR Mäuse ($\mu\text{Mt}^{-/-}$), im Alter von 8 bis 12 Wochen, keimfrei und unter OA-freier Diät.

2) Protokoll:

Systemische Sensibilisierung (OA 20 μg in 2 mg Alum, ip.) an den Tagen 1 und 14, Atemwegs-Provokation mit Allergen (OA 1% in PBS, 20 min tgl.) an den Tagen 28, 29 und 30 (ipNeb). Kontrollen waren nicht provozierte (ip) und nicht-sensibilisierte, provozierte (Neb) Mäuse. Messung der *in vivo* AR durch barometrische Plethysmographie (WBP) nach Stimulation mit ansteigenden Dosierungen von MCh (3 - 50 mg/ml in PBS) 2 Tage nach der letzten Provokation, am Tag 32.

3.3.3 Systemische Sensibilisierung von Mastzell-defizienten Mäusen

3.3.3.1 Einführung

Die Aktivierung von Mastzellen durch die Verknüpfung von mindestens zwei membranständigen hochaffinen IgE-Rezeptoren durch Bindung von spezifischem Allergen und IgE Antikörpern ist wesentlicher Bestandteil der allergischen Immunreaktion vom Typ-1 (*Sofortreaktion*). Die Freisetzung von Leukotrienen, Prostaglandinen und Histamin bewirkt die pathophysiologischen Veränderungen in der Folge eines Allergenkontaktes: Ödem, Hyperämie, Pruritus. Daneben spielt die Mastzelle aber auch als immunregulatorische Einheit eine Bedeutung. Mastzellen sind in der Lage, eine Vielzahl von Zytokinen *de novo* zu synthetisieren und dadurch auch auf die Funktion anderer Zellen Einfluss zu nehmen. Unter anderem wird diskutiert, ob und wie weit ortsständige Mastzellen in den Atemwegen als initiale IL-4 Produzenten für die Entwicklung der allergischen Immunreaktion, Atemwegs-Entzündung und AHR in der Lunge von Bedeutung sind. Wir untersuchten daher, ob die Gegenwart von Mastzellen Einfluß auf die Entwicklung von allergischer Sensibilisierung, eosinophiler Entzündung und AHR nehmen kann. Normale und Mastzell-defiziente Mäuse wurden im direkten Vergleich systemisch sensibilisiert und über die Atemwege mit Allergen provoziert. Gezeigt wird, dass alle gemessenen Parameter (IgE-Produktion, Th2-Zytokin-Produktion, eosinophile Infiltration, *in vivo* AR) bei den beiden Mausstämmen vergleichbare Ergebnisse aufzeigten. Die Gegenwart von Mastzellen ist in dem gewählten Modell für die Entstehung von Atemwegs-Entzündung und AHR also redundant.

3.3.3.2 Protokolle

1) Tiere:

Weibliche normale W/W und Mastzell-defiziente W/W^v Mäuse (Jackson) im Alter von 8-12 Wochen, keimfrei und unter OA-freier Diät.

2) Protokoll:

Systemische Sensibilisierung und Atemwegs-Provokation mit OA. Messung der *in vivo* AR durch invasive Bestimmung von R_L und C_{dyn}.

3.3.4 Systemische Sensibilisierung von Zytokin-defizienten Mäusen

3.3.4.1 Einführung

Das Vorhandensein von Mausstämmen, die für die Produktion ganz bestimmter Zytokine durch genetische Manipulation unfähig geworden sind, ermöglicht die genaue Analyse der Rolle einzelner Mediatoren bei pathologischen Mechanismen. Für die allergische Reaktion nehmen die Zytokine IL-4 - für die Induktion von IgE-Produktion, Adhäsionsmolekülen und Th2-Immunreaktion - und IL-5 - für die Differenzierung, Aktivierung und Lebensverlängerung von Eosinophilen - eine Schlüsselfunktion ein. Wir haben daher zunächst genetisch IL-4- und IL-5-defiziente mit normalen Mäusen hinsichtlich der Ausbildung von allergischer Sensibilisierung, Atemwegs-Entzündung und AHR verglichen. In einem zweiten Schritt wurden die defizienten Mäuse entweder mit allergen-spezifischem IgE oder mit cDNA für die Produktion des defizienten Zytokins über ein Vektorsystem (Adenovirus) rekonstituiert. Die Ergebnisse zeigen, dass bei den IL-4-defizienten Mäusen die allergen-spezifische IgE- und IgG1-Produktion fehlt. Zusätzlich bleiben sowohl bei IL-4- als auch bei IL-5-defizienten Mäusen die eosinophile Atemwegs-Entzündung und Entwicklung von *in vivo* AHR nach Sensibilisierung und Provokation mit Allergen aus. Beide Komponenten können durch die Rekonstitution von IL-5, nicht aber durch anti-OA IgE Gabe, bei IL-4-defizienten Mäusen wiederhergestellt werden. Dies verdeutlicht die herausragende Bedeutung der IL-5-vermittelten eosinophilen Entzündung und die relative Redundanz der IgE-Produktion für die Entstehung von AHR in diesem Modell.

3.3.5 Anti-IL-5 und anti-IgE Antikörper Behandlung

3.3.5.1 Einführung

Die Entwicklung von Allergen induziertem Asthma bronchiale ist durch die gleichzeitig erhöhte IgE-Produktion und Eosinophilie gekennzeichnet. In einer Studie an Mäusen wurde gezeigt, dass die Behandlung von sensibilisierten Mäusen mit nicht-anaphylaktogenem anti-IgE Antikörper nicht nur die erhöhten IgE Serumspiegel neutralisieren kann, sondern auch die T_H2-T-Zellaktivierung und Zytokin-Produktion vermindert, so dass eine geringere Eosinophilie als bei Kontrolltieren ausgebildet wird. Weiter wurde für IgE eine unterstützende Funktion bei der Antigen-Fokussierung und T-Zell-Aktivierung, möglicherweise vermittelt über CD23, beschrieben. Wir untersuchten daher, ob die Behandlung von sensibilisierten Mäusen mit anti-OA IgE vor Atemwegs-Provokation mit Allergen Einfluß auf die Entwicklung von eosinophiler Entzündung und AHR nehmen kann. Der Effekt von anti-IgE wurde direkt verglichen mit dem einer anti-IL-5 Behandlung, die bei den Atemwegs-sensibilisierten Mäusen zur Reduktion von Atemwegs-Entzündung und Verhinderung von AHR geführt hatte. Hier wurde das Modell der systemischen Sensibilisierung gewählt, welches hohe IgE-Produktion und starke eosinophile Infiltration induziert. Gezeigt wird, dass anti-IgE Behandlung signifikant die IgE Serumspiegel vermindert und anaphylaktische Reaktionen unterdrückt, ohne Einfluß auf Atemwegs-Entzündung und AHR zu nehmen. Im Gegensatz werden durch anti-IL-5 Behandlung erfolgreich die eosinophile Atemwegs-Infiltration und die Entwicklung von erhöhter in vivo AR verhindert.

3.3.5.2 Protokolle

1) Tiere:

Weibliche BALB/c Mäuse (Jackson) im Alter von 8-12 Wochen, keimfrei und unter OA-freier Diät.

2) Protokoll:

Systemische Sensibilisierung und Atemwegs-Provokation mit OA. Messung der *in vivo* AR durch WBP. Anti-IgE Behandlung (1-5: 200 µg in 200 µl PBS, iv) und anti-IL-5 Behandlung (TRFK-5: 50 µg in 30 µl PBS, intranasal) an den Tagen 27, und 2 hrs vor jeder Atemwegs-Provokation an den Tagen 28 and 29. (Abbildung 3.3.2). Kontrollen erhalten gleiche Mengen an Ratte-anti-Maus Ig zu den gleichen Zeitpunkten.

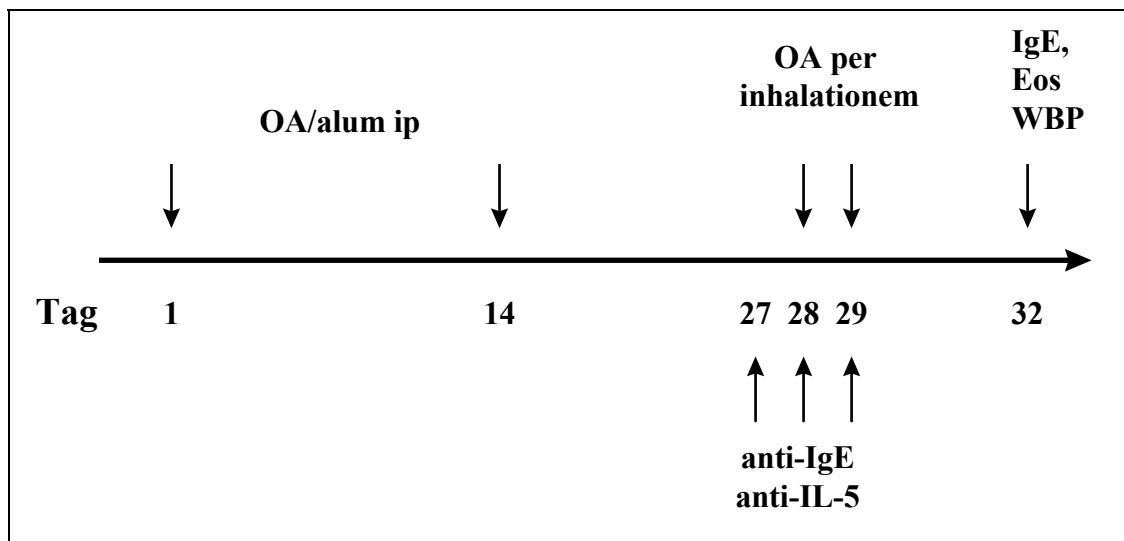


Abbildung 3.3.3: Protokoll der anti-IgE und anti-IL-5 Behandlung

4. Kapitel

Beantwortung der Fragen und Diskussion

4.1 Wie unterscheiden sich *unterschiedliche Modelle* der Sensibilisierung hinsichtlich IgE-Produktion, eosinophiler Entzündung und Entwicklung von AHR?

- 12 **Hamelmann E.** ZUR ENTSTEHUNG VON ATEMWEGS-ENTZÜNDUNG UND ATEMWEGS-HYPERREAKTIVITÄT: EINBLICKE AUS DEM ASTHMA MAUS-MODELL. *Pneumologie* 1999;53:307-312.

4.2 Welche Bedeutung haben *B-Zellen*, allergen-spezifische *IgE*-Produktion und *IgE*-vermittelte *Mastzell*-Aktivierung für die Entwicklung von Atemwegs-Entzündung und AHR?

- 13 Hamelmann E, Takeda K, Oshiba A, Gelfand EW. ROLE OF IGE IN THE DEVELOPMENT OF ALLERGIC AIRWAY INFLAMMATION AND AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS-A MURINE MODEL. *Allergy*. 1999;54:297-305.

4.3 Welche Bedeutung spielen *T-Zellen* und *T-Zell-Zytokine* für die Entwicklung von Atemwegs-Entzündung und AHR?

- 14. Hamelmann E, Wahn U, Gelfand EW.** ROLE OF TH2 CYTOKINES IN THE DEVELOPMENT OF ALLERGEN-INDUCED AIRWAY INFLAMMATION AND HYPERRESPONSIVENESS. *Intl. Arch. Allergy Immunol* 1999;118:90-94.

4.4 Welche Bedeutung haben *IL-5* und *IL-5*-vermittelte eosinophile Atemwegs-Infiltration für die Entwicklung von Atemwegs-Entzündung und AHR?

15. Hamelmann E, Gelfand EW. ROLE OF IL-5 IN THE DEVELOPMENT OF ALLERGEN-INDUCED AIRWAY HYPERRESPONSIVENESS. *Intl. Arch. Allergy Immunol* 1999;120:8-16.

16. Hamelmann E and Gelfand EW. IL-5 INDUCED AIRWAY EOSINOPHILIA - THE KEY TO ASTHMA ? *Immunol. Reviews* 2001;179:182-191.

4.5 Welche möglichen *therapeutischen Ansätze* können daraus gefolgert werden?

17. E Hamelmann. ANTI-IGE UND ANTI-IL-5 – NEUE THERAPEUTISCHE KONZEPTE FÜR DIE BEHANDLUNG VON ALLERGIEN. *Allergologie* 2000;23(12):585-588

18. Blümchen K., T. Kallinich, E Hamelmann. ANTI-IL-5 THERAPY. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2001;1(3):433-453.

19. Hamelmann E, Rolinck-Werninghaus C, Wahn U. FROM IGE TO ANTI-IGE – WHERE DO WE STAND. *Allergy* 2002

4.6 Aussichten

Das zunehmende Verständnis der immunologischen Grundlagen der allergischen Reaktion (siehe vorangehende Kapitel) hat zur Einführung neuer immunmodulierender, anti-inflammatorischer Strategien geführt, die gezielt an einzelnen Abschnitten der inflammatorischen Kaskade der allergischen Entzündung angreifen (Abb. 4.6.1). Dabei kommen verschiedene präventive und therapeutische Ansätze zur Anwendung (Tab. 4.6.1):

Tabelle 4.6.1: Immunmodulierende anti-allergische Therapie

Prinzip/ Ansatzpunkt	Beispiel
Immunsuppression	CsA* FK 506*
Antigenpräsentation/ Ko-Stimulation ①	Anti-B7.2 Anti-CD28 Anti-ICOS
Th1-Induktion ②	Mikrobielle Substanzen (CpG*, LPS, BCG*) Th1-Zytokine: IFN- γ *, IL-12*, IL-18
Th2-Inhibition ③	Anti-Zytokine: Anti-IL-4*, Anti-IL-13 Anti-Rezeptoren: Anti-IL-4R* Mutierte Zytokine: IL-4-Peptid* Lösliche Rezeptoren: sIL-4R*, sIL-5R, sIL-13R Signalübertragung: STAT-6, GATA-3
Eosinophile Entzündung ④	Anti-IL-5* Anti-Eotaxin
Leukozytäre Infiltration/ Adhäsionsmoleküle (AM) ⑤	Zelluläre AM: VLA-4*, Chemokine Endotheliale/epitheliale AM: VCAM-1, ELAM-1
Allergische Mediatoren ⑥	Anti-IgE* Anti-Leukotriene* Anti-Prostaglandine*

(Die Zahlen im Kreis verweisen auf den Ansatzpunkt in Abb. 4.6.1) *In klinischer Prüfung

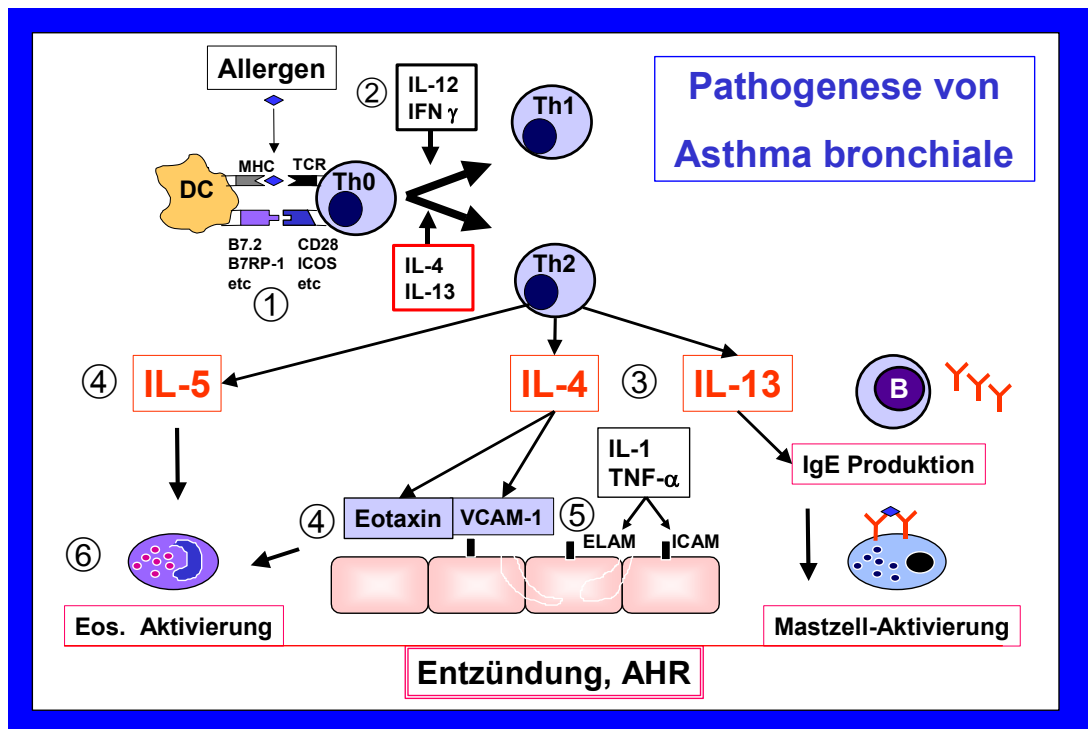


Abbildung 4.6.1: Angriffspunkte für innovative Therapien bei Asthma bronchiale.

5. Zusammenfassung

Erkrankungen des allergischen Formenkreises (Asthma bronchiale, Atopische Dermatitis, Allergische Rhino-Konjunktivitis) sind in ständiger Zunahme begriffen. Für den in der Klinik tätigen Pädiater stellt das allergische Asthma bronchiale die wichtigste Erkrankung aus dieser Gruppe dar. Asthma ist die häufigste chronische Atemwegs-Erkrankung im Kindesalter und verursacht durch Medikation und Hospitalisation enorme volkswirtschaftliche Kosten.

Kardinale Symptome von Asthma sind reversibler Bronchospasmus nach Exposition mit z.B. Allergenen (Atemwegs-Obstruktion), eine funktionell abnorme glatte Atemwegsmuskulatur, die durch eine verstärkte Kontraktilität nach unspezifischer Stimulation gekennzeichnet ist (Bronchiale Hyperreagibilität oder Atemwegs-Hyperreaktivität, AHR), und das Vorliegen einer chronischen Entzündung der kleinen und mittleren Atemwege (Atemwegs-Inflammation, AI).

Derzeitig finden für die Behandlung von Asthma bronchiale lediglich die symptomatische Therapie der Obstruktion mit muskelrelaxierenden Medikamenten (Bedarfstherapie) und die unspezifische anti-entzündliche Therapie mit steroidal Antiphlogistika (Dauertherapie) regelmäßige und breite Anwendung. Während die Mehrzahl der Patienten hiermit relativ beschwerdefrei eingestellt werden kann, gibt es aber auch Asthmatiker, die unter den Nebenwirkungen einer hochdosierten, systemischen Steroid-Dauertherapie leiden (steroid-pflichtiges Asthma), oder trotz der intensiven Anwendung von Kortikoiden nicht symptomfrei bleiben (steroid-resistentes Asthma). Für diese Patientengruppe fehlt bislang eine effektive, nebenwirkungsarme und spezifisch anti-asthmatische Therapie. Grundlage für die Etablierung innovativer Strategien für die Behandlung von Asthma kann jedoch nur die genaue Kenntnis der pathophysiologischen Mechanismen sein, die zur Ausbildung der klinischen Symptome führen.

Allergischen Erkrankungen liegt eine fehlgeleitete Immunreaktion gegen Umweltstoffe, wie z.B. Tierhaarepithelien, Blütenpollen oder Lebensmittel zugrunde. Mittlerweile gilt als gesichert, dass ein Ungleichgewicht in der Antwort von T-Lymphozyten auf diese Antigene die wesentliche Grundlage für die Ausbildung des

allergischen Phänotyps darstellt. Bei allergischen Patienten überwiegt die Produktion von sog. Th2-Zytokinen. Diese sind von T-Zellen produzierte Botenstoffe, die für die Induktion und Regulierung der wesentlichen pathognomonischen Mechanismen bei der allergischen Immunreaktion verantwortlich sind. Durch Interleukin (IL)-4 und IL-13 kommt es zur gesteigerten Produktion von allergen-spezifischen IgE-Antikörpern, die Grundlage für die Aktivierung von Mastzellen und die Entwicklung der allergischen Frühreaktion (early asthmatic reaction). Durch IL-5, IL-3 und GM-CSF werden eosinophile Zellen aktiviert und wandern in die Atemwege ein. Hier entwickelt sich das Bild einer chronischen Atemwegs-Entzündung, und die Folge ist die allergische Spätreaktion (late asthmatic reaction). Der genaue Mechanismus und die Interaktion von T-Zell-Zytokinen, IgE-Produktion und eosinophiler AI ist nicht völlig geklärt und Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Für die immunologischen Untersuchungen von AI und AHR wurde die Maus als Modell gewählt, die durch ihre gut definierte Immunologie und die Vielzahl von verfügbaren immunologischen “Werkzeugen” wie z.B. Antikörper und genetisch homogenen Stämmen entscheidende Vorteile bietet. Die in jüngerer Zeit entwickelten genetisch manipulierten Mausstämme ermöglichen darüber hinaus die genaue Analyse der Rolle einzelner Faktoren in der Pathogenese einer Erkrankung, da ihr vollständiges Fehlen (Defizienz) oder ihre Überexpression (Transgenität) direkte Rückschlüsse auf ihre Funktion erlauben.

Zunächst wurden unterschiedliche Modelle der allergischen Sensibilisierung und Atemwegs-Provokation mit Allergen etabliert und miteinander verglichen. Das erste Modell, die Atemwegs-Sensibilisierung mit ausschließlicher Gabe von Allergen als Aerosol, imitiert den natürlichen Sensibilisierungsweg über die inhalative Route beim asthmatischen Patienten. Dieser Modus führt zu geringer allergen-spezifischer IgE-Produktion, einer marginalen inflammatorischen Reaktion in den Atemwegen und zu unspezifischer AHR, messbar *in vitro* durch elektrische Feldstimulation von trachealen Segmenten. Eine ausgeprägte inflammatorische Komponente oder die Ausbildung von *in vivo* AHR wie bei asthmatischen Patienten fehlen jedoch in diesem Modell. Als zweites wurde das Modell der passiven Sensibilisierung mit allergen-spezifischem IgE gefolgt von Allergen-Provokationen der Atemwege etabliert. Dieses Modell erlaubt im Gegensatz zum vorherigen die Unterscheidung des Einflusses von IgE und Allergen-Provokation der Atemwege. Auch hier entwickelt sich eine nur geringe, aber für die Ausbildung der AHR erforderliche eosinophile AI, die über die

in vitro Bestimmung messbar ist. Als drittes Modell wurde die systemische Sensibilisierung mit Allergen gefolgt von Allergen-Provokationen der Atemwege etabliert. In diesem Modell kommt es zu hoher IgE-Produktion, und es herrscht eine ausgeprägte, eosinophile AI vor, die durch spezifische Immunohistochemie darstellbar und quantifizierbar ist. Für die Messung der AHR wurden zwei unterschiedliche *in vivo* Methoden entwickelt, die invasive Bestimmung des Atemwegswiderstandes und die Ganzkörper-Plethysmographie am nicht narkotisierten Tier.

Durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern und genetisch alterierten Mausstämmen wurden in den drei unterschiedlichen Modellen der Einfluss und die Interaktion der wesentlichen Parameter der allergischen Immunreaktion für die Entwicklung von AI und AHR definiert. In den ersten beiden Modellen (Atemwegs- und passive Sensibilisierung) wurde anhand von T-Zell- und B-Zell-defizienten Mausstämmen und durch Einsatz von Antikörpern gegen T-Zellen oder Zytokine gezeigt, dass für die Entwicklung von eosinophiler AI die T-Zell-vermittelte Produktion von IL-5, für die Entwicklung von *in vitro* AHR das Zusammenspiel von allergen-spezifischer IgE-Produktion und eosinophiler AI notwendig ist. Im Modell der systemischen Sensibilisierung konnte in Mäusen, die genetisch defizient für B-Zellen oder Mastzellen oder mit anti-IgE Antikörpern behandelt waren, eine eosinophile AI und *in vivo* AHR wie bei normalen Tieren ausgelöst werden. Im Gegensatz hierzu kam es bei IL-4- oder IL-5-defizienten Mäusen oder nach Behandlung mit anti-IL-5 Antikörpern weder zu inflammatorischen Reaktionen noch zu funktionellen Veränderungen in den Atemwegen.

Es kann hieraus gefolgert werden, dass bei allergen-induzierter AHR mit nur gering ausgeprägter AI ein gegen das erhöhte IgE gerichteter Ansatz (z.B. anti-IgE Antikörper) erfolgreich bei der Behandlung von Asthma sein kann. Bei Vorliegen von massiver AI scheint eine gegen die eosinophile Infiltration gerichtete Strategie (z.B. anti-IL-4/5 Antikörper) jedoch erfolgversprechender zu sein.

6. Literaturverzeichnis

1. BANNER AS. The increase in asthma prevalence. *Chest* 1995;**108**:301-302.
2. BEASLEY R, CRANE J, LAI CK, PEARCE N. Prevalence and etiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000.Feb.;**105**.(2.Pt.2.):S466.-72. **105**:S466-S472
3. BURNEY P. Epidemiology of asthma. *Allergy* 1993;**48**:17-21.
4. DOYLE R. Asthma worldwide. *Sci.Am.*2000.Jun.;**282**.(6.):30. **282**:30
5. HOLGATE ST. The epidemic of allergy and asthma. *Nature* 1999;**402**:B2-B4
6. MITCHELL EA. Asthma epidemiology: clues and puzzles. *Pediatr.Pulmonol.Suppl.* 1999;**18**:31-3.:31-33.
7. MITKA M. Why the rise in asthma? New insight, few answers. *JAMA* 1999;**281**:2171-2172.
8. ARM JP, LEE TH. The Pathobiology of Bronchial Asthma. *Adv Immunol* 1992;**51**:323-382.
9. ANONYMOUS Global Initiative for Asthma: Global strategy for asthma management and prevention NHLBI/WHO workshop report. National Heart, Lung and Blood Institute **Publication No. 95-3659, January 1995.** 1995;
10. COCKCROFT DW. Airway hyperresponsiveness in asthma. *Hosp.Pract.(Off.Ed.)* 1990;**25**:111-119.
11. COCKCROFT DW. Bronchial inhalation tests. I. Measurement of nonallergic bronchial responsiveness. *Ann.Allergy* 1985;**55**:527-534.
12. COCKCROFT DW. Bronchial inhalation tests. II. Measurement of allergic (and occupational) bronchial responsiveness. *Ann.Allergy* 1987;**59**:89-98.
13. COCKCROFT DW, MARCINIUK DD, HURST TS, ET AL. Methacholine challenge: test-shortening procedures. *Chest* 2001.Dec.;**120**.(6.):1857.-60. **120**:1857-1860.
14. DE JONGSTE JC, JONGEJAN RC, KERREBIJN KF. Control of airway caliber by autonomic nerves in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am.Rev Respir.Dis.* 1991;**143**:1421-1426.

15. DE JONGSTE JC, MONS H, BONTA IL, KERREBIJN KF. Nonneural components in the response of fresh human airways to electric field stimulation. *J Appl.Physiol.* 1987;**63**:1558-1566.
16. DE JONGSTE JC, MONS H, BONTA IL, KERREBIJN KF. In vitro responses of airways from an asthmatic patient. *Eur.J Respir.Dis.* 1987;**71**:23-29.
17. BENSON MK. Bronchial hyperreactivity. *Br.J Dis.Chest* 1975;**69**:227-239.
18. JAMES AL, PARE PD, HOGG JC. The mechanics of airway narrowing in asthma. *Am.Rev Respir.Dis.* 1989;**139**:242-246.
19. HOGG JC. Bronchial mucosal permeability and its relationship to airways hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 1981;**67**:421-425.
20. HARGREAVE FE, DOLOVICH J, O'BYRNE PM, RAMSDALE EH, DANIEL EE. The origin of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1986;**78**:825-832.
21. PARKER CW, SMITH JW. Alterations in cyclic adenosine monophosphate metabolism in human bronchial asthma. I. Leukocyte responsiveness to -adrenergic agents. *J Clin Invest.* 1973;**52**:48-59.
22. CONOLLY ME, GREENACRE JK. The lymphocyte beta-adrenoceptor in normal subjects and patients with bronchial asthma: the effect of different forms of treatment on receptor function. *J Clin Invest.* 1976;**58**:1307-1316.
23. RICHARDSON PS, STERLING GM. Effects of beta-adrenergic receptor blockade on airway conductance and lung volume in normal and asthmatic subjects. *Br.Med.J* 1969;**3**:143-145.
24. TOWNLEY RG, MCGEADY S, BEWTRA A. The effect of beta adrenergic blockade on bronchial sensitivity to acetyl-beta-methacholine in normal and allergic rhinitis subjects. *J Allergy Clin Immunol* 1976;**57**:358-366.
25. BARNES PJ. New concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponsiveness. *Agents Actions Suppl* 1987;**21**:225-237.
26. BARNES PJ. Neural control of human airways in health and disease. *Am.Rev Respir.Dis.* 1986;**134**:1289-1314.
27. BARNES PJ. Neural mechanisms in asthma. *Br.Med.Bull.* 1992;**48**:149-168.
28. BARNES PJ. Neural mechanisms in asthma: new developments. *Pediatr.Pulmonol.Suppl.* 1997;**16**:82-83.

29. BARNES PJ. Non-adrenergic non-cholinergic neural control of human airways. *Arch Int Pharmacodyn.Ther.* 1986;**280**:208-228.
30. LAMMERS JW, BARNES PJ, CHUNG KF. Nonadrenergic, noncholinergic airway inhibitory nerves. *Eur.Respir.J* 1992;**5**:239-246.
31. WARD JK, BARNES PJ, SPRINGALL DR, ET AL. Distribution of human i-NANC bronchodilator and nitric oxide-immunoreactive nerves. *Am.J Respir.Cell Mol.Biol.* 1995;**13**:175-184.
32. HOGG JC, JAMES AL, PARE PD. Evidence for inflammation in asthma. *Am.Rev Respir.Dis.* 1991;**143**:S39-S42
33. BARNES PJ, CHUNG KF, PAGE CP. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol.Rev* 1998;**50**:515-596.
34. CHUNG KF. Mediators of bronchial hyperresponsiveness. *Clin Exp Allergy* 1990;**20**:453-458.
35. RAIBLE DG, LENAHAAN T, FAYVILEVICH Y, KOSINSKI R, SCHULMAN ES. Pharmacologic characterization of a novel histamine receptor on human eosinophils. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 1994;**149**:1506-1511.
36. VINCENC KS, BLACK JL, YAN K, ARMOUR CL, DONNELLY PD, WOOLCOCK AJ. Comparison of in vivo and in vitro responses to histamine in human airways. *Am.Rev Respir.Dis.* 1983;**128**:875-879.
37. FINNERTY JP, HOLGATE ST. Evidence for the roles of histamine and prostaglandins as mediators in exercise-induced asthma: the inhibitory effect of terfenadine and flurbiprofen alone and in combination. *Eur.Respir.J.* 1990;**3**:540-547.
38. GLEICH GJ. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1990;**85**:422-436.
39. GLEICH GJ, FLAVAHAN NA, FUJISAWA T, VANHOUTTE PM. The eosinophil as a mediator of damage to respiratory epithelium: a model for bronchial hyperreactivity. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1988;**81**:776-781.
40. GLEICH GJ, ADOLPHSON C. Bronchial hyperreactivity and eosinophil granule proteins. *Agents Actions Suppl.* 1993;**43**:223-230.
41. COYLE AJ, MITZNER W, IRVIN CG. Cationic proteins alter smooth muscle function by an epithelium- dependent mechanism. *J Appl.Physiol.* 1993;**74**:1761-1768.

42. COYLE AJ, ACKERMAN SJ, IRVIN CG. Cationic proteins induce airway hyperresponsiveness dependent on charge interactions. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1993;**147**:896-900.
43. COYLE AJ, UCHIDA D, ACKERMAN SJ, MITZNER W, IRVIN CG. Role of cationic proteins in the airway. Hyperresponsiveness due to airway inflammation. [Review]. *Am.J Respir.Crit.Care Med.* 1994;**150**:S63-71.
44. JACOBY DB, GLEICH GJ, FRYER AD. Human eosinophil major basic protein is an endogenous allosteric antagonist at the inhibitory muscarinic M2 receptor. *J.Clin.Invest.* 1993;**91**:1314-1318.
45. GUNDEL RH, LETTS LG, GLEICH GJ. Human eosinophil major basic protein induces airway constriction and airway hyperresponsiveness in primates. *J.Clin.Invest.* 1991;**87**:1470-1473.
46. BENTLEY AM, MENZ G, STORZ C, ET AL. Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1992;**146**:500-506.
47. BIENENSTOCK J. An update on mast cell heterogeneity. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1988;**81**:763-769.
48. GIBSON PG, ALLEN CJ, YANG JP, ET AL. Intraepithelial mast cells in allergic and nonallergic asthma. Assessment using bronchial brushings. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1996;**148**:80-86.
49. STEVENS RL, AUSTEN KF. Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. [Review]. *Immunol.Today* 1989;**10**:381-386.
50. BLANK U, RA C, MILLER L, WHITE K, METZGER H, KINET JP. Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature* 1989;**337**:187-189.
51. PRESTA L, SHIELDS R, O'CONNELL L, ET AL. The binding site on human immunoglobulin E for its high affinity receptor. *J Biol.Chem.* 1994;**269**:26368-26373.
52. GALLI SJ. New concepts about the mast cell. [Review]. *N.Engl.J.Med.* 1993;**328**:257-265.
53. MARTIN TR, GALLI SJ, KATONA IM, DRAZEN JM. Role of mast cells in anaphylaxis. Evidence for the importance of mast cells in the cardiopulmonary

- alterations and death induced by anti-IgE in mice. *J Clin.Invest.* 1989;**83**:1375-1383.
54. CASALE TB, WOOD D, RICHERSON HB, ZEHR B, ZAVALA D, HUNNINGHAKE GW. Direct evidence of a role for mast cells in the pathogenesis of antigen-induced bronchoconstriction. *J.Clin.Invest.* 1987;**80**:1507-1511.
 55. CORRIGAN CJ, KAY AB. The roles of inflammatory cells in the pathogenesis of asthma and of chronic obstructive pulmonary disease. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1991;**143**:1165-8; discussion 1175-6.
 56. DJUKANOVIC R, ROCHE WR, WILSON JW, ET AL. Mucosal inflammation in asthma. [Review]. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1990;**142**:434-457.
 57. HOLGATE ST, KAY AB. Mast cells, mediators and asthma. [Review]. *Clin.Allergy* 1985;**15**:221-234.
 58. BEASLEY R, ROCHE WR, ROBERTS JA, HOLGATE ST. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1989;**139**:806-817.
 59. ACKERMAN V, MARINI M, VITTORI E, BELLINI A, VASSALI G, MATTOLI S. Detection of cytokines and their cell sources in bronchial biopsy specimens from asthmatic patients. Relationship to atopic status, symptoms, and level of airway hyperresponsiveness. *Chest* 1994;**105**:687-696.
 60. GALLI SJ, GORDON JR, WERSHIL BK. Cytokine production by mast cells and basophils. *Curr Opin Immunol* 1991;**3**:865-872.
 61. GALLI SJ, WERSHIL BK, GORDON JR, MARTIN TR. Mast cells: immunologically specific effectors and potential sources of multiple cytokines during IgE-dependent responses. [Review]. *Ciba.Found.Symp.* 1989;**147**:53-65; discussion 65-73.
 62. YING S, DURHAM SR, CORRIGAN CJ, HAMID Q, KAY AB. Phenotype of cells expressing mRNA for TH2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and TH1-type (interleukin 2 and interferon gamma) cytokines in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatic and normal control subjects. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1995;**12**:477-487.
 63. HOWARTH PH, DURHAM SR, LEE TH, KAY AB, CHURCH MK, HOLGATE ST. Influence of albuterol, cromolyn sodium and ipratropium

- bromide on the airway and circulating mediator responses to allergen bronchial provocation in asthma. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1985;**132**:986-992.
64. HUTSON PA, CHURCH MK, CLAY TP, MILLER P, HOLGATE ST. Early and late-phase bronchoconstriction after allergen challenge of nonanesthetized guinea pigs. I. The association of disordered airway physiology to leukocyte infiltration [published erratum appears in *Am Rev Respir Dis* 1990 Feb;141(2):518]. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1988;**137**:548-557.
 65. HUTSON PA, HOLGATE ST, CHURCH MK. The effect of cromolyn sodium and albuterol on early and late phase bronchoconstriction and airway leukocyte infiltration after allergen challenge of nonanesthetized guinea pigs. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1988;**138**:1157-1163.
 66. CLUTTERBUCK EJ, SANDERSON CJ. Regulation of human eosinophil precursor production by cytokines: a comparison of recombinant human interleukin-1 (rhIL-1), rhIL-3, rhIL- 5, rhIL-6, and rh granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1990;**75**:1774-1779.
 67. LOPEZ AF, BEGLEY CG, WILLIAMSON DJ, WARREN DJ, VADAS MA, SANDERSON CJ. Murine eosinophil differentiation factor. An eosinophil-specific colony-stimulating factor with activity for human cells. *J.Exp.Med.* 1986;**163**:1085-1099.
 68. LOPEZ AF, SANDERSON CJ, GAMBLE JR, CAMPBELL HD, YOUNG IG, VADAS MA. Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J.Exp.Med.* 1988;**167**:219-224.
 69. MCKENZIE AN, BARRY SC, STRATH M, SANDERSON CJ. Structure-function analysis of interleukin-5 utilizing mouse/human chimeric molecules. *Embo J* 1991;**10**:1193-1199.
 70. SIMON HU, YOUSEFI S, SCHRANZ C, SCHAPOWAL A, BACHERT C, BLASER K. Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia. *J Immunol.* 1997;**158**:3902-3908.
 71. STERN M, MEAGHER L, SAVILL J, HASLETT C. Apoptosis in human eosinophils. Programmed cell death in the eosinophil leads to phagocytosis by macrophages and is modulated by IL-5. *J.Immunol.* 1992;**148**:3543-3549.
 72. TAI PC, SUN L, SPRY CJ. Effects of IL-5, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM- CSF) and IL-3 on the survival of human blood eosinophils in vitro. *Clin.Exp.Immunol.* 1991;**85**:312-316.

73. BJERKE T, POULSEN LK, ZIONCHEK K, NIELSEN LP, KOCHAN J, JARDIEU P. Expression of the high-affinity immunoglobulin E receptor alpha-subunit in human blood eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;**113**:302-304.
74. CAPRON M, BAZIN H, JOSEPH M, CAPRON A. Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *J.Immunol.* 1981;**126**:1764-1768.
75. CAPRON M, KUSNIERZ JP, PRIN L, ET AL. Cytophilic IgE on human blood and tissue eosinophils: detection by flow microfluorometry. *J.Immunol.* 1985;**134**:3013-3018.
76. CAPRON M, TRUONG MJ, ALDEBERT D, ET AL. Heterogeneous expression of CD23 epitopes by eosinophils from patients. Relationships with IgE-mediated functions. *Eur.J.Immunol.* 1991; **21**:2423-2429.
77. GOUNNI AS, LAMKHIOUED B, DELAPORTE E, ET AL. The high-affinity IgE receptor on eosinophils: from allergy to parasites or from parasites to allergy?. [Review]. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1994;**94**:1214-1216.
78. GOUNNI AS, LAMKHIOUED B, OCHIAI K, ET AL. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* 1994;**367**:183-186.
79. HUMBERT M, GRANT JA, TABORDA-BARATA L, ET AL. High-affinity IgE receptor (FcepsilonRI)-bearing cells in bronchial biopsies from atopic and nonatopic asthma. *Am.J Respir.Crit.Care Med.* 1996;**153**:1931-1937.
80. TRUONG MJ, GRUART V, LIU FT, PRIN L, CAPRON A, CAPRON M. IgE-binding molecules (Mac-2/epsilon BP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity. *Eur.J.Immunol.* 1993;**23**:3230-3235.
81. MOQBEL R, LACY P. New concepts in effector functions of eosinophil cytokines. *Clin Exp.Allergy* 2000.Dec.;**30**.(12.):1667.-71.
82. LACY P, MOQBEL R. Eosinophil cytokines. *Chem.Immunol* 2000.;**76**.:134.-55.
83. MOQBEL R. Eosinophil-derived cytokines in allergic inflammation and asthma. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1996;**796**:209-17
84. MOQBEL R, LEVI-SCHAFFER F, KAY AB. Cytokine generation by eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 1994;**94**:1183-1188.

85. HAMELMANN E, GELFAND EW. IL-5-induced airway eosinophilia--the key to asthma? *Immunol Rev* 2001.Feb.;**179**.:182.-91.
86. KAY AB. Eosinophils and asthma. *N.Engl.J.Med.* 1991;**324**:1514-1515.
87. KAY AB, CORRIGAN CJ. Asthma. Eosinophils and neutrophils. *Br.Med.Bull.* 1992;**48**:51-64.
88. ABRAHAM WM, SIELCZAK MW, AHMED A, ET AL. Alpha 4-integrins mediate antigen-induced late bronchial responses and prolonged airway hyperresponsiveness in sheep. *J Clin.Invest.* 1994;**93**:776-787.
89. SPRINGER TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;**346**:425-434.
90. BOCHNER BS, SCHLEIMER RP. The role of adhesion molecules in human eosinophil and basophil recruitment. *J Allergy Clin Immunol* 1994;**94**:427-438.
91. EBISAWA M, BOCHNER BS, GEORAS SN, SCHLEIMER RP. Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. I. Role of endothelial and eosinophil adhesion molecules in IL-1 beta-induced transendothelial migration. *J Immunol.* 1992;**149**:4021-4028.
92. NAKAJIMA H, SANO H, NISHIMURA T, YOSHIDA S, IWAMOTO I. Role of vascular cell adhesion molecule 1/very late activation antigen 4 and intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function-associated antigen 1 interactions in antigen-induced eosinophil and T cell recruitment into the tissue. *J Exp.Med.* 1994;**179**:1145-1154.
93. RABB HA, OLIVENSTEIN R, ISSEKUTZ TB, RENZI PM, MARTIN JG. The role of the leukocyte adhesion molecules VLA-4, LFA-1, and Mac-1 in allergic airway responses in the rat. *Am.J Respir.Crit.Care Med.* 1994;**149**:1186-1191.
94. SANO H, NAKAGAWA N, NAKAJIMA H, YOSHIDA S, IWAMOTO I. Role of vascular cell adhesion molecule-1 and platelet- activating factor in selective eosinophil migration across vascular endothelial cells. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 1995;**107**:533-540.
95. TAYLOR BM, KOLBASA KP, CHIN JE, ET AL. Roles of adhesion molecules ICAM-1 and alpha4 integrin in antigen-induced changes in microvascular permeability associated with lung inflammation in sensitized brown Norway rats. *Am.J Respir.Cell Mol.Biol.* 1997;**17**:757-766.

96. SCHLEIMER RP, STERBINSKY SA, KAISER J, ET AL. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J Immunol.* 1992;**148**:1086-1092.
97. NICKEL R, BECK LA, STELLATO C, SCHLEIMER RP. Chemokines and allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 1999;**104**:723-742.
98. UGUCCIONI M. Chemokines and chemokine receptors in allergic diseases. *Pediatr.Pulmonol.Suppl.* 1999;**18**: 113-114.
99. ROTHENBERG ME, ZIMMERMANN N, MISHRA A, ET AL. Chemokines and chemokine receptors: their role in allergic airway disease. *J Clin Immunol* 1999;**19**:250-265.
100. BAGGIOLINI M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;**392**:565-568.
101. ELSNER J, KAPP A. The chemokine network in eosinophil activation. *Allergy Asthma Proc.*2001.**May.-Jun.;****22.(3.):**139.-48
102. LLOYD C. Chemokines in allergic lung inflammation. *Immunology* 2002.**Feb.;****105.(2.):**144.-54
103. GONZALO JA, LLOYD CM, WEN D, ET AL. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Exp.Med.* 1998;**188**:157-167.
104. JOSE, P. J., GRIFFITHS/JOHNSON, D. A., COLLINS, P. D., WALSH, D. T., MOQBEL, R., TOTTY, N. F., TRUONG, O., HSUAN, J. J., AND WILLIAMS, T. J. Eotaxin: A potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J.Exp.Med.* **179**, 881-887. 1994.
105. ABRAHAM WM, AHMED A, SIELCZAK MW, NARITA M, ARRHENIUS T, ELICES MJ. Blockade of late-phase airway responses and airway hyperresponsiveness in allergic sheep with a small-molecule peptide inhibitor of VLA-4. *Am.J Respir.Crit.Care Med.* 1997;**156** :696-703.
106. CHIN JE, WINTERROWD GE, HATFIELD CA, ET AL. Involvement of intercellular adhesion molecule-1 in the antigen- induced infiltration of eosinophils and lymphocytes into the airways in a murine model of pulmonary inflammation. *Am.J Respir.Cell Mol.Biol.* 1998;**18**:158-167.

107. PRETOLANI M, RUFFIE C, LAPA SJ, JOSEPH D, LOBB RR, VARGAFTIG BB. Antibody to very late activation antigen 4 prevents antigen- induced bronchial hyperreactivity and cellular infiltration in the guinea pig airways. *J Exp.Med.* 1994;**180**:795-805.
108. WOLYNIEC WW, DE SANCTIS GT, NABOZNY G, ET AL. Reduction of antigen-induced airway hyperreactivity and eosinophilia in ICAM-1-deficient mice. *Am.J Respir.Cell Mol.Biol.* 1998;**18**:777-785.
109. HATFIELD CA, BRASHLER JR, WINTERROWD GE, ET AL. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice have antibody responses but impaired leukocyte recruitment. *Am.J Physiol.* 1997;**273**:L513-23.
110. HOLT PG. Regulation of antigen-presenting cell function(s) in lung and airway tissues. *Eur.Respir.J.* 1993;**6**:120-129.
111. PIETERS J. MHC class II restricted antigen presentation. *Curr.Opin.Immunol* 1997;**9**:89-96.
112. WEENINK SM, GAUTAM AM. Antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunol Cell Biol.* 1997;**75**:69-81.
113. MILLER JF. Immune self-tolerance mechanisms. *Transplantation* 2001.Oct.27.;**72**.(8.Suppl.):S5.-9
114. SPRENT J, KISHIMOTO H. The thymus and central tolerance. *Transplantation* 2001.Oct.27.;**72**.(8.Suppl.):S25.-8.
115. GUERDER S, FLAVELL RA. T-cell activation. Two for T. *Curr.Biol.* 1995;**5**:866-868.
116. OLIVE D, VAN LIER R. CD28 and T-cell activation. *Res.Immunol* 1995;**146**:127-129.
117. ERB P, KENNEDY M, WASSMER P, HUEGLI G. Antigen-presenting cells and T cell activation. *Agents Actions* 1986;**19**:266-268.
118. BENTLEY AM, MAESTRELLI P, SAETTA M, ET AL. Activated T-lymphocytes and eosinophils in the bronchial mucosa in isocyanate-induced asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1992;**89**:821-829.
119. BENTLEY AM, MENG Q, ROBINSON DS, HAMID Q, KAY AB, DURHAM SR. Increases in activated T lymphocytes, eosinophils, and cytokine mRNA expression for interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony- stimulating factor in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1993;**8**:35-42.

120. BRADLEY BL, AZZAWI M, JACOBSON M, ET AL. Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1991;**88**:661-674.
121. CORRIGAN CJ, HARTNELL A, KAY AB. T lymphocyte activation in acute severe asthma. *Lancet* 1988;**1**:1129-1132.
122. CORRIGAN CJ, KAY AB. CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma. Relationship to disease severity and atopic status. *Am.Rev.Respir.Dis.* 1990;**141**:970-977.
123. KAY AB, DURHAM SR. T-lymphocytes, allergy and asthma. *Clin Exp Allergy* 1991;**1**:17-21.
124. WALKER C, KAEGI MK, BRAUN P, BLASER K. Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1991;**88**:935-942.
125. GARLISI CG, FALCONE A, HEY JA, ET AL. Airway eosinophils, T cells, Th2-type cytokine mRNA, and hyperreactivity in response to aerosol challenge of allergic mice with previously established pulmonary inflammation. *Am.J Respir.Cell Mol.Biol.* 1997;**17**:642-651.
126. HAMID Q, AZZAWI M, YING S, ET AL. Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. *J.Clin.Invest.* 1991;**87**:1541-1546.
127. KAMEI T, OZAKI T, KAWAJI K, ET AL. Production of interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor by T cells of patients with bronchial asthma in response to *Dermatophagoides farinae* and its relation to eosinophil colony-stimulating factor. *Am.J Respir.Cell Mol.Biol.* 1993;**9**:378-385.
128. ROBINSON D, HAMID Q, BENTLEY A, YING S, KAY AB, DURHAM SR. Activation of CD4⁺ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1993;**92**:313-324.

129. BENNICH HH, ISHIZAKA K, JOHANSSON SG, ROWE DS, STANWORTH DR, TERRY WD. Immunoglobulin E: a new class of human immunoglobulin. *Immunology* 1968;**15**:323-324.
130. JOHANSSON SG. Raised levels of a new immunoglobulin class (IgND) in asthma. *Lancet* 1967;**2**:951-953.
131. ISHIZAKA K, ISHIZAKA T. Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J Immunol* 1967;**99**:1187-1198.
132. ISHIZAKA K, ISHIZAKA T, HORNBROOK MM. Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J Immunol* 1966;**97**:75-85.
133. HOWARTH PH, DURHAM SR, KAY AB, HOLGATE ST. The relationship between mast cell-mediator release and bronchial reactivity in allergic asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 1987;**80**:703-711.
134. BURROWS B, MARTINEZ FD, HALONEN M, BARBEE RA, Cline MG. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N.Engl.J Med.* 1989;**320**:271-277.
135. ILLI S, VON MUTIUS E, LAU S, ET AL. The pattern of atopic sensitization is associated with the development of asthma in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2001.Nov.;**108**.(5.Part.1.):709-714.
136. KULIG M, BERGMANN R, NIGGEMANN B, BUROW G, WAHN U. Prediction of sensitization to inhalant allergens in childhood: evaluating family history, atopic dermatitis and sensitization to food allergens. The MAS Study Group. Multicentre Allergy Study. *Clin Exp.Allergy* 1998;**28**:1397-1403.
137. ISHIZAKA T, ISHIZAKA K. Biology of immunoglobulin E. *Prog Allergy* 1975;**19**:60-121.
138. OLTZ EM. Regulation of antigen receptor gene assembly in lymphocytes. *Immunol Res.*2001.;**23**.(2.-3.):121.-33.
139. ALT FW, BLACKWELL TK, DEPINHO RA, RETH MG, YANCOPOULOS GD. Regulation of genome rearrangement events during lymphocyte differentiation. *Immunol Rev* 1986;**89**:5-30
140. MANIS JP, TIAN M, ALT FW. Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends.Immunol* 2002.Jan.;**23**.(1.):31-39.

141. RADBRUCH A. The molecular basis of immunoglobulin class switching: switch transcription versus switch recombination. *Immunol Res.* 1991;**10**:381-385.
142. VERCELLI D, JABARA HH, ARAI K, GEHA RS. Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T-B cell interaction involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC-class II antigens. *J Exp Med* 1989;**169**:1295-1307.
143. VERCELLI D. Novel insights into class switch recombination. *Curr.Opin.Allergy Clin Immunol* 2002.Apr.;**2**.(2.):147-151.
144. VERCELLI D. Immunoglobulin E and its regulators. *Curr.Opin.Allergy Clin Immunol* 2001.Feb.;**1**.(1.): 61-65.
145. LAMAN JD, CLAASSEN E, NOELLE RJ. Functions of CD40 and its ligand, gp39 (CD40L). *Crit.Rev Immunol* 1996;**16**:59-108.
146. NOELLE RJ, LEDBETTER JA, ARUFFO A. CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation. *Immunol Today* 1992;**13**:431-433.
147. DISANTO JP, BONNEFOY JY, GAUCHAT JF, FISCHER A, DESAINT BASILE G. CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993;**361**:541-543.
148. JABARA HH, SCHNEIDER LC, SHAPIRA SK, ET AL. Induction of germline and mature Ce transcripts in human B cells stimulated with rIL-4 and EBV. *J Immunol* 1990;**145**:3468-3473.
149. JABARA HH, AHERN DJ, VERCELLI D, GEHA RS. Hydrocortisone and IL-4 induce IgE isotype switching in human B cells. *J Immunol* 1991;**147**:1557-1560.
150. HUDAK SA, GOLLNICK SO, CONRAD DH, KEHRY MR. Murine B-cell stimulatory factor 1 (interleukin 4) increases expression of the Fc receptor for IgE on mouse B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;**84**:4606-4610.
151. LEBMAN DA, COFFMAN RL. Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell- stimulated clonal B cell cultures. *J Exp Med* 1988;**168**:853-862.
152. PENE J, ROUSSET F, BRIERE F, ET AL. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1988;**85**:6880-6884.

153. FINKELMAN FD, KATONA IM, URBAN JF, JR., SNAPPER CM, OHARA J, PAUL WE. Suppression of in vivo polyclonal IgE responses by monoclonal antibody to the lymphokine B-cell stimulatory factor 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1986;**83**:9675-9678.
154. FINKELMAN FD, KATONA IM, URBAN JF, JR., ET AL. IL-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J.Immunol.* 1988;**141**:2335-2341.
155. COYLE AJ, LE GROS G, BERTRAND C, ET AL. Interleukin-4 is required for the induction of lung Th2 mucosal immunity. *Am.J Respir.Cell Mol.Biol.* 1995;**13**:54-59.
156. KOPF M, LE GROS G, BACHMANN M, LAMERS MC, BLUETHMANN H, KOHLER G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 1993;**362**:245-248.
157. LAWRENCE RA, ALLEN JE, GREGORY WF, KOPF M, MAIZELS RM. Infection of IL-4-deficient mice with the parasitic nematode *Brugia malayi* demonstrates that host resistance is not dependent on a T helper 2-dominated immune response. *J Immunol.* 1995;**154**:5995-6001.
158. WILLS KARP M, LUYIMBAZI J, XU X, ET AL. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma [see comments]. *Science* 1998;**282**:2258-2261.
159. ZURAWSKI G, DE VRIES JE. IL-13, an IL-4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol.Today* 1994;**15**:19-26.
160. COFFMAN RL, CARTY J. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. *J.Immunol.* 1986;**136**:949-954.
161. FINKELMAN FD, KATONA IM, MOSMANN TR, COFFMAN RL. IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses. *J.Immunol.* 1988;**140**:1022-1027.
162. PENE J, ROUSSET F, BRIERE F, ET AL. IgE production by normal human B cells induced by alloreactive T cell clones is mediated by IL-4 and suppressed by IFN-gamma. *J.Immunol.* 1988;**141**:1218-1224.
163. SANDERSON CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 1992;**79**:3101-3109.
164. SANDERSON CJ. The biological role of interleukin 5. *Int.J.Cell Cloning.* 1990;**8 Suppl 1**:147-53; discussion 153-4.

165. SANDERSON CJ, O'GARRA A, WARREN DJ, KLAUS GG. Eosinophil differentiation factor also has B-cell growth factor activity: proposed name interleukin 4. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1986;**83**:437-440.
166. SANDERSON CJ, WARREN DJ, STRATH M. Identification of a lymphokine that stimulates eosinophil differentiation in vitro. Its relationship to interleukin 3, and functional properties of eosinophils produced in cultures. *J Exp Med* 1985;**162**:60-74.
167. STRATH M, SANDERSON CJ. Detection of eosinophil differentiation factor and its relationship to eosinophilia in *Mesocostoides corti*-infected mice. *Exp Hematol* 1986;**14**:16-20.
168. DEVOS R, PLAETINCK G, CORNELIS S, GUISEZ Y, VAN DER HEYDEN J, TAVERNIER J. Interleukin-5 and its receptor: a drug target for eosinophilia associated with chronic allergic disease. *J Leukoc.Biol.* 1995;**57**:813-819.
169. DRAZEN JM, ARM JP, AUSTEN KF. Sorting out the Cytokines of Asthma. *J.Exp.Med.* 1996;**183**:1-5.
170. HAMELMANN E, GELFAND EW. Role of IL-5 in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;**120**:8-16.
171. KOIKE M, TAKATSU K. IL-5 and its receptor: which role do they play in the immune response?. [Review]. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 1994;**104**:1-9.
172. HUMBERT M, CORRIGAN CJ, KIMMITT P, TILL SJ, KAY AB, DURHAM SR. Relationship between IL-4 and IL-5 mRNA expression and disease severity in atopic asthma. *Am.J Respir.Crit.Care Med.* 1997;**156**:704-708.
173. TILL S, DICKASON R, HUSTON D, ET AL. IL-5 secretion by allergen-stimulated CD4+ T cells in primary culture: relationship to expression of allergic disease. *J Allergy Clin.Immunol.* 1997;**99**:563-569.
174. COCKCROFT DW. Airway hyperresponsiveness and late asthmatic responses. *Chest* 1988;**94**:178-180.
175. COCKCROFT DW. Allergen-induced late asthmatic responses and increased airway responsiveness. *Allergy Proc.* 1992;**13**:1-2.

176. GAGA M, FREW AJ, VARNEY VA, KAY AB. Eosinophil activation and T lymphocyte infiltration in allergen-induced late phase skin reactions and classical delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 1991;**147**:816-822.
177. FREW AJ, KAY AB. Eosinophils and T-lymphocytes in late-phase allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1990;**85**:533-539.
178. FREW AJ, KAY AB. The relationship between infiltrating CD4+ lymphocytes, activated eosinophils, and the magnitude of the allergen-induced late phase cutaneous reaction in man. *J Immunol* 1988;**141**:4158-4164.
179. ROBINSON DS, YING S, BENTLEY AM, ET AL. Relationships among numbers of bronchoalveolar lavage cells expressing messenger ribonucleic acid for cytokines, asthma symptoms, and airway methacholine responsiveness in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993;**92**:397-403.
180. ROBINSON DS, HAMID Q, YING S, ET AL. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N.Engl.J.Med.* 1992;**326**:298-304.
181. MOSMANN TR, CHERWINSKI H, BOND MW, GIEDLIN MA, COFFMAN RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol.* 1986;**136**:2348-2357.
182. CHERWINSKI HM, SCHUMACHER JH, BROWN KD, MOSMANN TR. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp.Med.* 1987;**166**:1229-1244.
183. CHER DJ, MOSMANN TR. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J Immunol* 1987;**138**:3688-3694.
184. GARSIDE P, MOWAT AM. Polarization of Th-cell responses: a phylogenetic consequence of nonspecific immune defence? *Immunol Today* 1995;**16**:220-223.
185. DEL PRETE G. The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *Int Rev Immunol* 1998;**16**:427-455.
186. FLAVELL RA, RINCON M, ZHENG WP, ET AL. The regulation of CD4 T cell differentiation. *Eur.Cytokine.Netw.* 1998;**9**:26-32.

187. SEDER RA, PAUL WE, DAVIS MM, ET AL. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4⁺ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 1992;**176**:1091-1098.
188. GAZZINELLI RT, WYSOCKA M, HAYASHI S, ET AL. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1994;**153**:2533-2543.
189. GAZZINELLI RT, HIENY S, WYNN TA, WOLF S, SHER A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1993;**90**:6115-6119.
190. BRADDING P, ROBERTS JA, BRITTEN KM, ET AL. Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1994;**10**:471-480.
191. PLAUT M, PIERCE JH, WATSON CJ, HANLEY-HYDE J, NORDAN RP, PAUL WE. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature* 1989;**339**:64-67.
192. ROMAGNANI S, PARRONCHI P, D'ELIOS MM, ET AL. An update on human Th1 and Th2 cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;**113**:153-156.
193. ROMAGNANI S. Biology of human TH1 and TH2 cells. *J Clin Immunol* 1995;**15**:121-129.
194. ROMAGNANI S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997;**18**:263-266.
195. ROMAGNANI S. Th1 and Th2 in human diseases. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996;**80**:225-235.
196. WANNER A, ABRAHAM WM, DOUGLAS JS, DRAZEN JM, RICHERSON HB, RAM JS. Models of airway hyperresponsiveness. *Am Rev Respir Dis* 1990;**141**:253-257.
197. COCKCROFT DW. Airway responses to inhaled allergens. *Can.Respir.J* 1998;**5** Suppl A:14A-7A.:14A-17A.
198. HEUSSER CH, WAGNER K, BEWS JP, ET AL. Demonstration of the therapeutic potential of non-anaphylactogenic anti-IgE antibodies in murine models of skin reaction, lung function and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;**113**:231-235.

199. LABERGE S, RABB H, ISSEKUTZ TB, MARTIN JG. Role of VLA-4 and LFA-1 in allergen-induced airway hyperresponsiveness and lung inflammation in the rat. *Am.J Respir.Crit.Care Med.* 1995;**151**:822-829.
200. FRYER AD, COSTELLO RW, YOST BL, ET AL. Antibody to VLA-4, but not to L-selectin, protects neuronal M2 muscarinic receptors in antigen-challenged guinea pig airways. *J Clin.Invest.* 1997;**99**:2036-2044.
201. MAUSER PJ, PITMAN A, WITT A, ET AL. Inhibitory effect of the TRFK-5 anti-IL-5 antibody in a guinea pig model of asthma. *Am.Rev Respir.Dis.* 1993;**148**:1623-1627.
202. VAN OOSTERHOUT AJ, VAN ARK I, FOLKERTS G, ET AL. Antibody to interleukin-5 inhibits virus-induced airway hyperresponsiveness to histamine in guinea pigs. *Am.J Respir.Crit.Care Med.* 1995;**151**:177-183.
203. HAMELMANN E, TAKEDA K, GELFAND EW. Animal Models of Airway Hyperresponsiveness. In: Shevach E, ed. New York: John Wiley and Sons, Inc., 2000;
204. FOLKERTS G, VAN ESCH B, JANSSEN M, NIJKAMP FP. Virus-induced airway hyperresponsiveness in guinea pigs in vivo: study of broncho-alveolar cell number and activity. *Eur.J Pharmacol.* 1992;**228**:219-227.
205. SCHWARZE J, HAMELMANN E, BRADLEY KL, TAKEDA K, GELFAND EW. Respiratory syncytial virus infection results in airway hyperresponsiveness and enhanced airway sensitization to allergen. *J Clin Invest.* 1997;**100**:226-233.
206. MARTIN TR, GERARD NP, GALLI SJ, DRAZEN JM. Pulmonary responses to bronchoconstrictor agonists in the mouse. *J Appl.Physiol.* 1988;**64**:2318-2323.
207. HAMELMANN E, SCHWARZE J, TAKEDA K, ET AL. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am.J Respir.Crit.Care Med.* 1997; **156**:766-775.

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinen akademischen Lehrern, die mich über die gesamte Zeit gefördert haben (in chronologischer Reihenfolge):

Herrn **Prof. Dr. Dr. Wolfgang Müller-Ruchholtz**, ehem. Direktor des Immunologischen Institutes in Kiel, der mich in die Immunologie eingeführt und meine Doktorarbeit angeleitet hat;

Herrn **Prof. Dr. Jürgen Schaub**, Direktor der Universitäts-Kinderklinik Kiel, der mich für die Pädiatrie begeistert und meinen akademischen Werdegang gefördert hat;

Herrn **Prof. Dr. Christian Rieger**, Direktor der Kinderklinik St. Joseph, Bochum, der mich in entscheidenden Momenten hilfreich beraten und mein Interesse für die Allergologie geweckt hat;

Herrn **Prof. Dr. Erwin Gelfand**, Direktor der Pädiatrie am National Jewish Center for Immunology and Respiratory Medicine in Denver, Colorado, dem ich insbesondere meine experimentell-wissenschaftliche Ausbildung und das Verständnis für die immunologischen Grundlagen verdanke. Erwin Gelfand hat mich während meiner gesamten Zeit in Denver und darüber hinaus uneingeschränkt unterstützt und meine Selbständigkeit bei der Bearbeitung und Beantwortung von wissenschaftlichen Fragestellungen großzügig gefördert.

Herrn **Prof. Dr. Ulrich Wahn**, Direktor der Klinik für Pädiatrie m.S. Pneumologie und Immunologie, Charité, Berlin, der mir in meiner pädiatrischen und allergologischen Weiterbildungszeit immer Lehrer und Vorbild war. Professor Wahn gewährte mir besonders auch in kritischen Momenten seine großzügige Unterstützung und Rückendeckung, um an der Verwirklichung meiner beruflichen Ziele festhalten zu können.

Für die immerwährende liebevolle Hilfe und Unterstützung auf allen meinen beruflichen und privaten Wegen möchte ich meiner **Familie** danken. Mein Dank gilt hier meinen Eltern, die meine schulische und universitäre Ausbildung ermöglichten; meiner ersten Frau Sabine, die bis zu ihrem Tod meinen Werdegang unterstützte; und meiner Frau Lydia und unseren Kindern, die mir Kraft und Lebensfreude schenken.

Ich möchte den vielen Kolleginnen und Kollegen aus Denver danken, die an der Durchführung der Versuche beteiligt gewesen sind oder durch wertvolle Diskussionen und Gespräche zu dem Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

Dres Akihiro Oshiba, Jürgen Schwarze, Katsuyuki Takeda, Gregory Cieslewicz, Angela Haczku, Gideon Lack;

Kathy Bradley und **Anthony Joetham** für wertvolle technische Unterstützung;

Professor Charles Irvin für die unentbehrliche Hilfe bei der Etablierung der Ganzkörper-Plethysmographie;

Professor Gary Larsen und **Joan Loader** für die Hilfe bei der Elektrischen Feldstimulation;

Phillippa Marrack für Kooperation und wertvolle Diskussionen;

Diana Nabighian für ihre redaktionelle Hilfe beim Abfassen von Schriften.

Professor Dr. med. Harald Renz, Direktor der Klinischen Chemie an der Universitätsklinik Marburg/Lahn, danke ich für die Unterstützung bei den beruflichen Wechseln nach Denver und Berlin.

Ich danke den MitarbeiterInnen im Labor in Berlin für die unermüdliche Aufbauarbeit und den täglichen Einsatz (alphabetisch): **Birgit Ahrens, Katharina Blümchen, Katrin Borgwald, Kerstin Gerhold, Thilo Kallinich, Nora Laske, David Quarcoo, Christine Seib, Philippe Stock und Susanne Toelpe.**

Für die finanzielle Unterstützung seit 1993 danke ich der **Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG).**

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

Datum

Unterschrift